

## 短鎖および中鎖プレニルニリン酸合成酵素の生成物 鎖長制御に関する研究

著者	広岡 和丈
学位授与機関	Tohoku University
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/55199">http://hdl.handle.net/10097/55199</a>



# 博士學位論文

論文題目 短鎖 および 中鎖 プレニルニリン酸  
合成酵素の 生成物 鎖長 制御に  
関する 研究

提出者 東北大学大学院工学研究科  
生物工学 専攻

学籍番号 97TD5606

氏名 広岡 和丈.



指 導 教 官	西野 徳三 教授
審 査 委 員 (○印は主査)	○ 西野 教授 1 野澤 教授 2 熊谷 教授 3 教授 4 教授



①

## 博士学位論文

論文題目

短鎖および中鎖プレニルニリン酸合成酵素の  
生成物鎖長制御に関する研究

提出者

東北大学大学院工学研究科  
生物工学専攻

学籍番号 97TD5606

氏 名 広岡 和丈



## 目次

第1章 序論	1
参考文献	7
第2章 古細菌由来ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素における生成物鎖長決定に重要なアミノ酸の同定	10
2-1 緒論	10
2-2 実験方法	12
試料	12
DNA シークエンス	12
プラスミドの構築	12
GGPP 合成酵素遺伝子に対するランダム変異導入	12
酵母の形質転換と <i>pet</i> 表現型を抑制する変異型 GGPP 合成酵素の選別	13
酵母からの変異型 GGPP 合成酵素の調製	14
大腸菌で変異型 GGPP 合成酵素を発現させるためのプラスミドの構築	14
大腸菌からの GGPP 合成酵素の調製	15
プレニルニリン酸合成酵素活性の測定	15
生成物分析	15
2-3 結果	17
酵母の呼吸欠損株を利用した選別法の構築	17
ランダム変異 GGPP 合成酵素ライブラリーからの呼吸欠損表現型を抑制する変異型酵素の選別	19
プレニルニリン酸合成酵素活性の測定と生成物分析の結果	19
生成物鎖長を決定するアミノ酸の特定	23
2-4 考察	24
参考文献	27
第3章 ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素のファルネシルニリン酸合成酵素への変換	30
3-1 緒論	30
3-2 実験方法	32
試料	32
DNA シークエンス	32
変異型 GGPP 合成酵素の作製	32
変異型 GGPP 合成酵素の調製	33
プレニルニリン酸合成酵素活性の測定と生成物分析	33



3-3 結果	34
部分的に FPP 合成酵素の配列をもつ GGPP 合成酵素変異体の作製	34
プレニルニリン酸合成酵素活性の測定と生成物分析の結果	34
I 型 FPP 合成酵素の生成物特異性に必須のアミノ酸の特定	36
II 型 FPP 合成酵素の生成物特異性に必須のアミノ酸の特定	37
生成物鎖長に対する基質濃度の効果	38
3-4 考察	40
参考文献	43
 第 4 章 短鎖プレニルニリン酸合成酵素の長鎖プレニルニリン酸合成酵素への改変	45
4-1 緒論	45
4-2 実験方法	48
試料	48
DNA シークエンス	48
変異型 GGPP 合成酵素の作製	48
変異型 GGPP 合成酵素の調製	49
プレニルニリン酸合成酵素活性の測定と生成物分析	49
変異型 FPP 合成酵素の作製	49
変異型 FPP 合成酵素の調製	50
プレニルニリン酸合成酵素活性の測定と生成物分析	50
4-3 結果	51
プレニル鎖の伸長を妨げるアミノ酸の探索	51
2 つの置換をもつ変異型 GGPP 合成酵素の活性測定	52
2 つの置換をもつ変異型 GGPP 合成酵素の生成物分析	53
3 つの置換をもつ変異型 GGPP 合成酵素の作製と生成物分析	55
C <sub>35</sub> よりも長鎖の生成物分析	55
変異型 FPP 合成酵素の生成物分析	57
反応条件の検討	58
4-4 考察	60
参考文献	63



第 5 章	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i> ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素の 114 位の ヒスチジンが生成物鎖長制御に果たす役割	66
5-1	緒論	66
5-2	実験方法	68
	試料	68
	GGPP 合成酵素の分子モデリング	68
	DNA シークエンス	68
	変異型 GGPP 合成酵素の作製	68
	変異型 GGPP 合成酵素の調製	68
	プレニルニリン酸合成酵素活性の測定と生成物分析	68
5-3	結果と考察	70
	GGPP 合成酵素の分子モデリング	70
	変異型 GGPP 合成酵素の活性測定	73
	変異型 GGPP 合成酵素の生成物分析	73
	114 位のヒスチジンが生成物鎖長制御に果たす役割	75
	参考文献	77
第 6 章	中鎖プレニルニリン酸合成酵素の生成物鎖長決定機構	78
6-1	緒論	78
6-2	実験方法	80
	試料	80
	一般操作	80
	変異型 HepPP 合成酵素発現系の構築	80
	変異型 HepPP 合成酵素の調製	81
	プレニルニリン酸合成酵素活性の測定と生成物分析	81
	HepPP 合成酵素の分子モデリング	81
6-3	結果	82
	HepPP 合成酵素における生成物鎖長決定に必須のアミノ酸の探索	82
	鎖延長を終結させる嵩高いアミノ酸の同定	83
	プレニル鎖を通過させる小さな側鎖のアミノ酸の同定	84
6-4	考察	85
	参考文献	90
第 7 章	結論	92
	参考文献	95



## 第 1 章 序論

天然には様々な鎖長の全トランス (*E*) 型プレニルニリン酸が存在し、それらは重要な生理機能をもつイソプレノイド化合物の生合成経路の中心に位置する (1, 2) (図 1-1)。例えば、ファルネシルニリン酸 (FPP,  $C_{15}$ ) は、多くの薬理活性をもつステロイド、ガン遺伝子産物 p21 に代表されるファルネシル化タンパク質、真核生物の糖輸送脂質であるドリコール、真核生物におけるシトクロムオキシダーゼの補因子であるヘム a などの生合成に利用される。またゲラニルゲラニルニリン酸 (GGPP,  $C_{20}$ ) は  $\beta$ -カロテンなどの生体色素であるカロテノイド、G タンパク質  $\gamma$  サブユニットなどのゲラニルゲラニル化タンパク質、光合成において中心的役割をする葉緑体、古細菌の細胞膜を構成しているエーテル結合脂質といった物質の前駆体である。一部の古細菌は、エーテル結合膜脂質にゲラニルファルネシルニリン酸 ( $C_{25}$ ) を利用する。 $C_{30}$ - $C_{50}$  の *E* 型プレニルニリン酸は電子輸送体として働くキノンの側鎖に利用される。チクル、グッタペルカなどの植物樹脂は、 $C_{500}$ - $C_{3500}$  の *E* 型プレニルニリン酸の誘導体である。植物中でのそれらの機能については明らかではないが、チューインガムの原料、海底ケーブルの絶縁材料、ゴルフボールのカバー、歯科用材料など広く産業に利用されている。これらの化合物の構造は天然ゴムに類似しているが、二重結合の立体化学が、チクル、グッタペルカではすべてトランス (*E*) 型であるのに対して、天然ゴムではほとんどがシス (*Z*) 型であること、天然ゴムの方がはるかに長い炭素鎖 (約  $C_{25000}$ ) であること等の相違がみられる。このような構造の違いのために物理的性質も大きく異なっている。天然ゴムが常温でかなりの弾性を示すのに対し、チクル、グッタペルカは常温では結晶性を示し、高温でゴム状となる (3, 4)。天然ゴムの二重結合は、ほとんどが *Z* 型であるが、その合成の際の縮合開始反応には *E* 型 FPP が主に使用される。したがって天然ゴムの合成にも FPP が不可欠である。

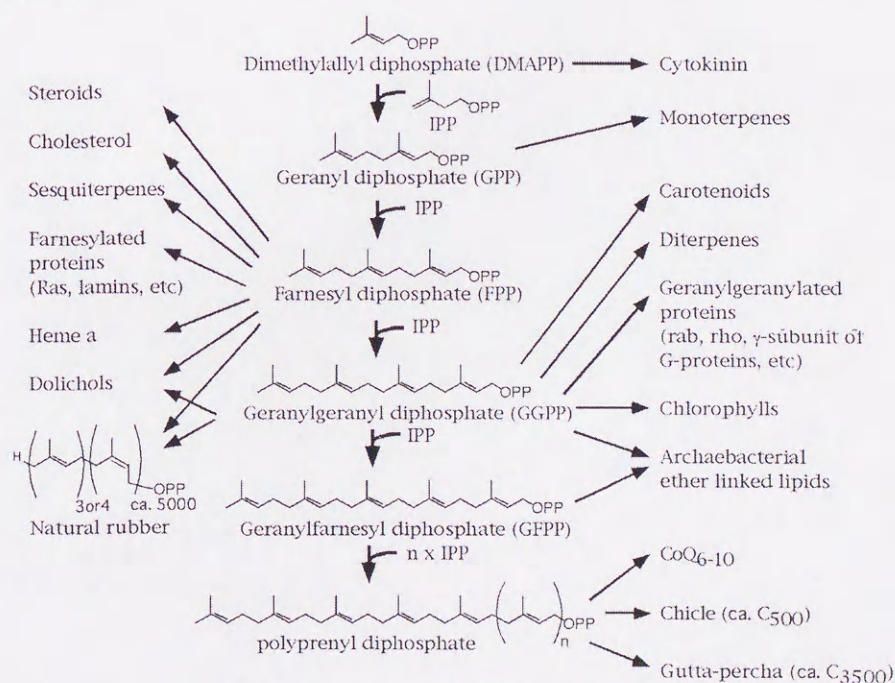


図 1-1 イソプレノイド生合成経路



様々な鎖長と機能をもつ *E* 型プレニルニリン酸は、プレニル基転移酵素として分類される *E* 型プレニルニリン酸合成酵素によって生合成される (1, 2, 5)。これらの酵素は、*E* 型プレニルニリン酸 (アリル性基質) を重合開始基質として、イソペンテニルニリン酸 (IPP、 $C_5$ ) をトランスの立体化学で順次 1'-4 縮合させるといふ反応を触媒し、反応過程は以下のように進行する。まず、アリル性基質のニリン酸基が脱離し、カルボカチオンが生成する。次いで、求電子的にカルボカチオンの C-1 炭素が、IPP の二重結合をつくる C-4 炭素に *si* 面から付加して 1'-4 結合が形成される。その後、IPP の C-2 炭素から *pro-R* 水素が脱離して二重結合が形成され、結果的に始めのアリル性基質よりも 1 イソプレン単位伸びた *E* 型プレニルニリン酸が生成する (図 1-2、図 1-3)。この生成物が次のアリル性基質となり、縮合反応が繰り返され、様々な鎖長の *E* 型プレニルニリン酸が合成される。例えば、FPP 合成酵素は、ジメチルアリルニリン酸 (DMAPP、 $C_5$ )、ゲラニルニリン酸 (GPP、 $C_{10}$ ) といったアリル性基質に IPP を縮合させ、FPP を最終生成物として与える。

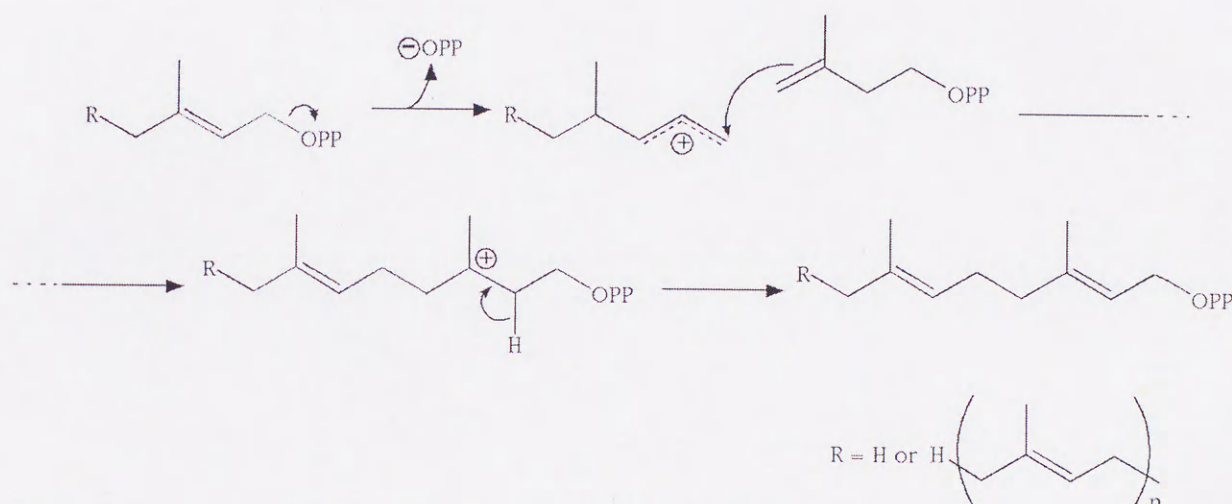


図 1-2 *E* 型プレニルニリン酸合成酵素による 1'-4 縮合反応

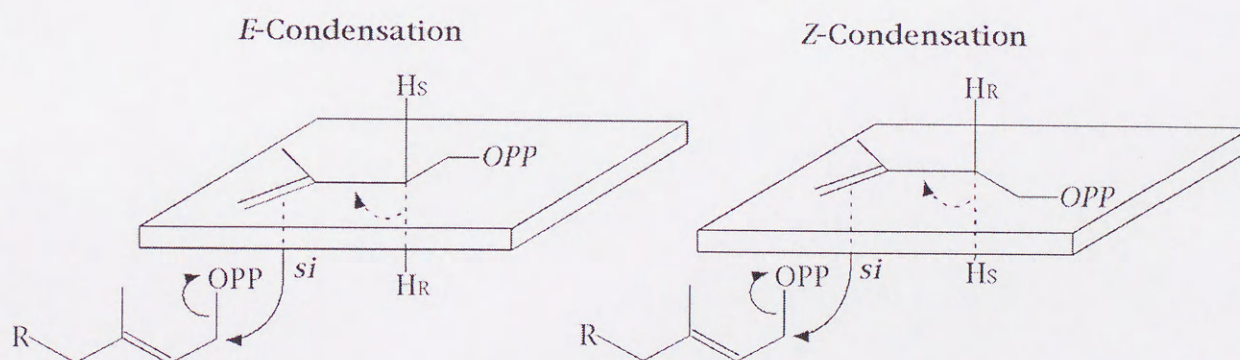


図 1-3 縮合反応の立体化学



1987 年以降、FPP 合成酵素 (6-10)、GGPP 合成酵素 (11-15)、ヘキサプレニルニリン酸 (HexPP, C<sub>30</sub>) 合成酵素 (16)、ヘプタプレニルニリン酸 (HepPP, C<sub>35</sub>) 合成酵素 (17)、オクタプレニルニリン酸 (OPP, C<sub>40</sub>) 合成酵素 (18)、ソラネシルニリン酸 (C<sub>45</sub>) 合成酵素 (19)、デカプレニルニリン酸 (C<sub>50</sub>) 合成酵素 (20) といった数多くの *E* 型プレニルニリン酸合成酵素の遺伝子が単離され、それらの推定アミノ酸配列の比較から、いくつかの保存領域が存在することがわかった (9, 21) (図 1-4)。特に、アスパラギン酸に富む 2 つのモチーフ (DDXX(X)D, X は任意のアミノ酸) は、これらの酵素に特徴的である。最初のモチーフ (First Aspartate-Rich Motif, FARM) にアリル性基質が、2 番目のモチーフ (Second Aspartate-Rich Motif, SARM) に IPP が、Mg<sup>2+</sup>や Mn<sup>2+</sup>といった 2 価金属イオンを介して基質のニリン酸基とモチーフのアスパラギン酸残基で結合すると考えられている。また、一次配列の相同性から、*E* 型プレニルニリン酸合成酵素は共通の祖先から分岐して進化したと推定されている (21)。

GGPS S.a. 1	-----MSYFDNYFNEIVNSV--NDIKSYI--SGDVP-KLYEA-S	34
GGPS M.t. 1	-----MTEVLDILRKYSVA--DKRIMECI--SDITPTLLKA-S	35
FPS H.s. 1	-----MNGDQNSDYAQKQDFVQHFQSVIRVLTEDMGHPEIGDAIA-RLKEV--	48
FPS R.r. 1	-----MNGDQKLDVHINQKQNFQHFQSVIRVLTEDMGHPEIGDAIA-RLKEV--	48
FPS B.s. 1	-----VAQLSVEQFLNEQKQAV--ETALSRYIERLEGA-KLKKAMA	39
FPS E.c. 1	-----MDFFPQLEACVKQKQAL--SRFIAPLP--FQNTA-VVET-MQ	37
GGPS A.t. 1	-----MASVTLGSHIVVHHHHHPSSILTKSRSSCPITLTKPTFSRKRVTSSSSSIVSSSVTKEDNLRQSEPSSDFMSYITTKAEV--NKALDSAV--PLREPLKHEAMS	108
GGPS E.u. 1	-----MTVCAGKHVHLTRDAAEQLLADIDR--RLDQLPV--EGERD-VVGAM-	44
GGPS S.c. 1	-----MEAKIDE--LIANDPVV--SSQNE-SLISK-P	26
HexPS B.s.1	-----MKLKAMYSLSDLLAAV--EEELERAV--QSEYG-PLGEA-A	36

	I	II	III	
GGPS S.a. 35	Y-HLETSGGKRLRPLILTIIS-SDLFGGQR-----ERAYYA-GAAIEVLHTFTLVHDDI--MDQDNIRRGPLTVHVKYGLPL-ATLAGDGLHAKAF-QLLTQA-LRG-LPSET-IKAKFD	138		
GGPS M.t. 36	E-HLITAGGKIRPSLALLS-CEAVGGNP-----EDAAGV-AAATELIHTFTSLIHDDI--MDQDNIRRGPLTVHVKYGLPL-ATLAGDGLHAKAF-QLLTQA-LRG-LPSET-IKAKFD	136		
FPS H.s. 49	L-EYNAIGGKYNRGLTVVAVFRELVPRKQDASLQRANTVGM-CVELLQAFFLVADDT--MOSSLTRRGQTCYQKPGVGLDAINDANLLEACIY-RLKLKY-CRE-OP--Y-YNLIE	158		
FPS R.r. 49	L-EYNTVGGKYNRGLTVVAVFRELVPRKQDASLQRANTVGM-CVELLQAFFLVADDT--MOSSLTRRGQTCYQKPGVGLDAINDANLLEACIY-RLKLKY-CRE-OP--Y-YNLIE	158		
FPS B.s. 40	Y-SLEAGGKIRPLLLST-VRALGKDP-----AVGLPV-ACAEMHTYSLIHDDLPAMDNDLRRGKPTNHKVFGEAM-ATLAGDGLTYAF-QLITEI-DDERIPPSVR-LRLIE	145		
FPS E.c. 38	Y-GALL-GGKRLRPLLYAT-GHMFVST-----NTLDAP-AAVECIHAYSLIHDDLPAMDNDLRRGKPTNHKVFGEAM-ATLAGDGLTYAF-QLITEI-DDERIPPSVR-LRLIE	145		
GGPS A.t. 109	Y-SLAGGKRVPRVLCIAA-CELVGGE-----STAMPA-RC AVEHHTYSLIHDDLPAMDNDLRRGKPTNHKVFGEAM-ATLAGDGLTYAF-QLITEI-DDERIPPSVR-LRLIE	143		
GGPS E.u. 45	R-EGALAPGKIRPLMLLLTARDLGCAVS-----HDGLDLACAVEMVHAASLIHDDLPAMDNDLRRGKPTNHKVFGEAM-ATLAGDGLTYAF-QLITEI-DDERIPPSVR-LRLIE	215		
GGPS S.c. 27	YNHILKPGKIRPLMLLLTARDLGCAVS-----DQLAIV-SQIVELLHNSSLIHDDI--EDNAPLRGGQITSHLIFGVPS-TINTANYMYFRAM-QLVQSQ--LTT--KEPL-YHNLIT	151		
HexPS B.s.37	L-HLLQAGGKIRPVEVLLA-ARFGQYDL-----ERMKHV-AVALELIHNSLHDDI--EDNAPLRGGQITSHLIFGVPS-TINTANYMYFRAM-QLVQSQ--LTT--KEPL-YHNLIT	129		

	FARM	
GGPS S.a. 139	IFTRSI--IIISEGQAVDM---EFED-R-IDIKEQEYLDMS-RKTA-ALFSASSSISGALAGAND--NDVRLMSDFGTNLGIAFQIYDDIL-GLTADKELGKPVFSIDREKKTIL	244
GGPS M.t. 137	VVVDSC--VKICEGQALDM---GFEE-R-LDVTEDEYMEMIY-KKTA-ALIAAATKAGAIMGASE--REVEALEDYKGFGLAFQIYDDIL-VVSDDESLGKPVGSDIAEGKMTLM	242
FPS H.s. 159	LFLLQSS--YQTEIGQTLDTLAPQGNVDL--VRFTKRYKSIVK-YKTAFFSYFYLPIAAAMPMAGTD-GEKEHANAKKILLDMGEFFQIQDDYLD-LFGDPSVTGK-IGTDIQNKCSNL	270
FPS R.r. 159	LFLLQSS--YQTEIGQTLDTLAPQGNVDL--GRYTEKRYKSIVK-YKTAFFSYFYLPIAAAMPMAGTD-GEKEHANAKKILLDMGEFFQIQDDYLD-LFGDPSVTGK-IGTDIQNKCSNL	270
FPS B.s. 146	RLAKAAGPEGMAGQADME---GEG-KTLLTLELEYIYH-R-HKTG-KMLQYSVHAGALIGGADA-RQTRLEDEFAAHGLAFQIYDDIL-IEGAEKIGKPVGSDQSNKATYP	252
FPS E.c. 144	ELASASGAGMGQALDLD---AEG-K-HVPLDALERTHR-HKTG-ALIRAAVRLGALSAG-DKGRRLPVLKYAESIGLAFQIYDDIL-VVSDDESLGKPVGSDIAEGKMTLM	252
GGPS A.t. 216	ELAKAIGTEGLVAGQVVDIS---SEG-LD-LNDVGLHELFHILHKTAL-ALLEASAVLGAIVGGSD--DEIERLRKFARCIIGLFGVQDDIL-VYKSKELGKTAKDLIADKLTYP	325
GGPS E.u. 152	ELSNAIGMGLVQGGFKDL---SEG-DKPRSAE-ATLMTNH-FKTS-TLFCASHQASIVANASS--EARDCLHRSFSLDGLQAFQIYDDIL-VVSDDESLGKPVGSDIAEGKMTLM	252
GGPS S.c. 130	IFNEEL--INLHRGQGLDIY--WRDPLP-E-IPTQEMVLMVM-NKTD-GLFRLTURLMEALSPSS--HGHSLVP-FINLLGIYQIYDDIL-NLKDQMSSEKGFADITEGKLSFP	237
HexPS B.s.134	VLAKTI--VEVCRGIEQIK---DKY-R-FDQPLRTYLRIR-RKTA-LLTAASQGLGALAAGAPE--PIVKKLYWF GHYVGMFSQITDDIL-FGTGEEQLGKPGSDLLQGNVTLP	239

	SARM	
GGPS S.a. 245	VIKTLEL---CKEDEKKIVLKALGNKSASKEELMSADIIKKY-SLDYAY-NLAKEYKNATDSLNQVSSKSDIPGKALKYLAFTIRRK	330
GGPS M.t. 243	VVKALFE---ASEEDRERLISILG--SGDEGSVAEATIFERYGATQYAH-EVALDYVMKAKERL-ETLEDSARD-ALMRTADFLEREH	325
FPS H.s. 271	VVQCLQR---ATPEQYQILKENYQKEAEK--VARVKALYEEL-DLPAVFLQYEESSYSHMALIEQYAA-PLPPAVFLG-LARKIYKRRK	353
FPS R.r. 271	VVQCLLR---ATPQQRQILEENYQKDEKVARVKALYEELDL-KSVF-F-KYEEDSYNR-LKSLIEQCSAPLPPSIFLE-LANKIYKRRK	353
FPS B.s. 253	ALLSLAG-----AKEKAFHIEAAQRHLRNA-DVDGAALAYICELVAARDH	297
FPS E.c. 252	ALLGLEK-----ARKKARDLDDARQSLKLAQES-LDTSALALADYIIQRNK	299
GGPS A.t. 326	KTMGLEK---SREFAEKLNREARDQLLGFSDKVAPLLALANY-JAYKQN	371
GGPS E.u. 260	AVEERLR---QHQLQASHELSAACQHGHTQHFQIQAQFCKLA-AVS	302
GGPS S.c. 238	IVHALNFYKTKGQTEQHNEILRLILLRTSDKDKIKLILQILEFD-TNSLAY---TKNFINQLVNMKNENKYLPLDASHSDATNLHDELYIYIDHSEL	335
HexPS B.s.240	VL YA--L---SDERVKATAAVGPETDVAEMAVISAIRKTD-AIERSY-ALSDRYLDKALHLDLGL-PHNEARG-LLRDLALYIGKRDY	320

GGPS: GGPP synthase  
FPS: FPP synthase  
HexPS: HexPP synthase

S. a.: *Sulfolobus acidocaldarius*  
M. t.: *Methanobacterium thermoautotrophicum*  
H. s.: *Homo sapiens*  
R. r.: *Rattus rattus*  
B. s.: *Bacillus stearothermophilus*  
E. c.: *Escherichia coli*  
A. t.: *Arabidopsis thaliana*  
E. u.: *Erwinia uredovora*  
S. c.: *Saccharomyces cerevisiae*

図 1-4 *E* 型プレニルニリン酸合成酵素のアミノ酸配列の比較



しかし、類似性の高いこれらの酵素にも相違点がいくつか存在する。第一に、利用可能なアリル性基質の鎖長が酵素ごとに異なっている (図 1-5)。例えば、*Micrococcus luteus* ソラネシルニリン酸合成酵素 (22) は、DMAPP ( $C_5$ ) をアリル性基質として利用できず、GPP ( $C_{10}$ ) を最短鎖アリル性基質とする。*Micrococcus luteus* B-P26 HexPP 合成酵素 (23) や *Bacillus subtilis* HepPP 合成酵素 (24) では、FPP ( $C_{15}$ ) が最短鎖アリル性基質である。酵母やは乳類の GGPP 合成酵素 (25, 26) は、FPP を唯一のアリル性基質とするが、他の GGPP 合成酵素 (11-15) は、DMAPP、GPP、FPP をアリル性基質として利用可能である。

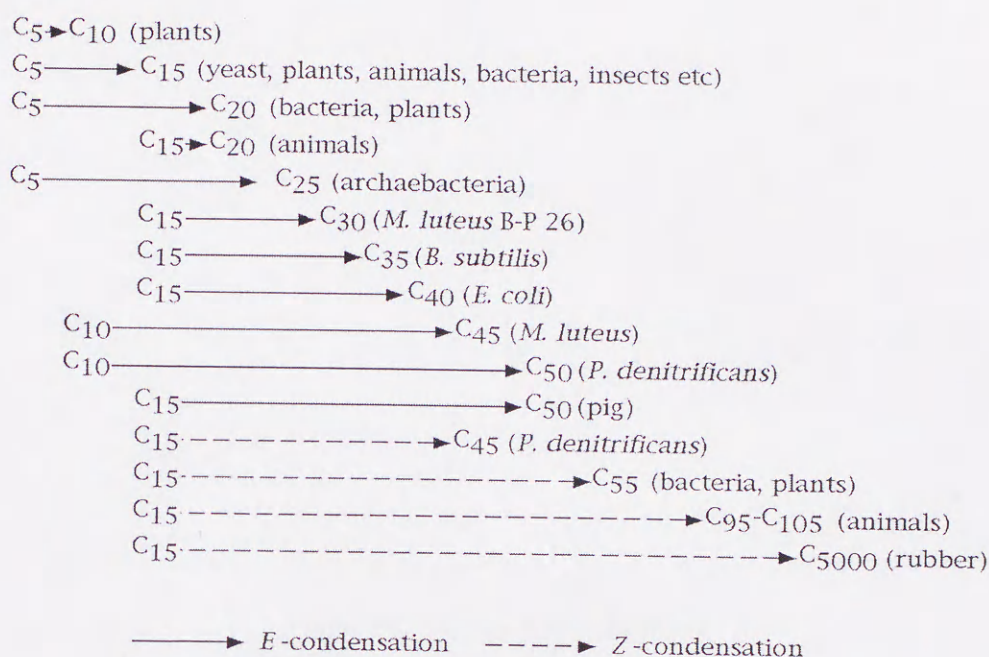


図 1-5 アリル性基質と最終生成物の鎖長

第二の相違点として、酵素の四次構造と活性発現に必要な補因子に、それぞれ差異がある (図 1-6)。短鎖プレニルニリン酸 ( $C_{15}$ - $C_{20}$ ) 合成酵素は、強固に会合したホモダイマーを形成する。これに対して、中鎖プレニルニリン酸 ( $C_{30}$ - $C_{35}$ ) 合成酵素は、互いに異なる 2 つのサブユニットで構成される。これらのサブユニットは解離して存在し、単独では触媒機能をもたないが、基質存在下では会合して酵素機能を発現する。このようなヘテロダイマー酵素としては、*M. luteus* B-P26 HexPP 合成酵素 (23)、*B. subtilis* HepPP 合成酵素 (24)、*Bacillus stearothermophilus* HepPP 合成酵素 (17) があげられる。短鎖および中鎖プレニルニリン酸合成酵素では、基質と酵素の結合のための  $Mg^{2+}$  あるいは  $Mn^{2+}$  等の 2 価金属イオンのみが活性発現に要求される。 $E$  型長鎖プレニルニリン酸 ( $C_{40}$ - $C_{50}$ ) 合成酵素は、強固に会合したホモダイマーを形成し、2 価金属イオンの添加で触媒活性を示す。しかし、それだけでは活性が低く、疎水性の生成物を酵素から解離させ、触媒ターンオーバーを維持するためにキャリアタンパク質を必要とし、それによって活性が高められる。このような酵素の例としては、*M. luteus* ソラネシルニリン酸合成酵素 (22)、大腸菌由来 OPP 合成酵素 (18)、*Schizosaccharomyces pombe* デカプレニルニリン酸合成酵素 (20) がある。



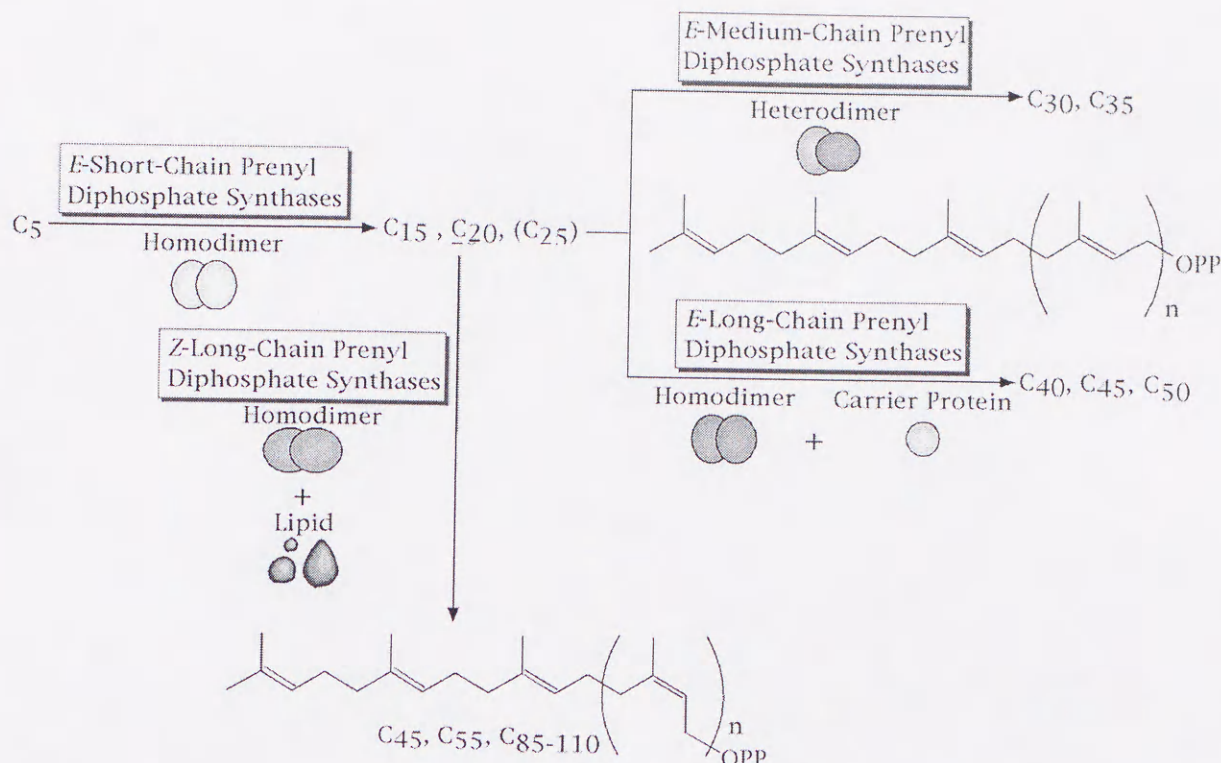


図 1-6 プレニルニリン酸合成酵素の分類

一方、*Z*型長鎖プレニルニリン酸合成酵素は、強固に会合したホモダイマーを形成し、活性発現には、2 価金属イオンに加えてリン脂質や界面活性剤が要求される。1998 年に清水らが *M. luteus* ウンデカプレニルニリン酸 ( $C_{55}$ ) 合成酵素の遺伝子を単離し、初めて *Z*型長鎖プレニルニリン酸合成酵素のアミノ酸配列が明らかとなった (27)。その後も、*Z*型長鎖プレニルニリン酸合成酵素の遺伝子がいくつか単離された (28, 29)。その結果、*Z*型長鎖プレニルニリン酸合成酵素は、*E*型プレニルニリン酸合成酵素との配列相同性を全くもたないことがわかった。これらの結果は、*E*型酵素と *Z*型酵素が独立して進化したことを強く示唆している。

前述のように、最終生成物鎖長によって *E*型プレニルニリン酸合成酵素の四次構造は異なる。しかし、その違いが最終生成物の鎖長決定にどう関与するかは不明である。*E*型プレニルニリン酸合成酵素内のアミノ酸のどれが、どのような機構で正確に鎖延長反応を終結させ最終生成物鎖長を決定するかは、これまで未解明であった。FPP 合成酵素は FPP を、GGPP 合成酵素は GGPP を最終生成物として与え、それより長鎖のニリン酸エステルを生成することはない。最終生成物鎖長はそれぞれの酵素で厳密に規定され、この生成物特異性が *E*型プレニルニリン酸合成酵素の最大の相違点である (図 1-5)。

本研究では、好熱好酸性古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius* 由来 GGPP 合成酵素 (14) に変異を導入して、野生型とは異なる鎖長の生成物を与える変異型酵素を作製し、それらを解析することで生成物鎖長を決定する領域の特定とその制御機構の解明を試みた (30-33) (第 2 章・第 5 章)。今回研究に用いた *S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素は、進化の過程において *E*型プレニルニリン酸合成酵素の共通の祖先型酵素から早い段階



で分岐した、つまり系統樹の根元に位置すると考えられている (21)。したがって、系統樹の末端に位置する酵素よりも生成物特異性の改変は容易であると予想された。この酵素の生成物特異性の改変は、酵素を人工的に進化させる試みということができた。

また、変異型 *S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素の解析から得られた情報をもとに、短鎖プレニル二リン酸合成酵素である *B. stearrowthermophilus* FPP 合成酵素 (9) と中鎖プレニル二リン酸合成酵素である *B. stearrowthermophilus* HepPP 合成酵素 (17) の生成物特異性の改変も試みた (32, 34) (第 4 章、第 6 章)。

本研究で得られた結果は、すべての *E* 型プレニル二リン酸合成酵素が、共通の機構で生成物鎖長を制御することを強く示唆するものとなった (35)。

また、本研究で使用した *S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素、*B. stearrowthermophilus* FPP 合成酵素、*B. stearrowthermophilus* HepPP 合成酵素はいずれも耐熱性酵素であるので、様々な鎖長の生成物を与える変異型酵素を獲得できれば、それらの耐熱性と様々な生成物特異性を利用して新規物質生産への応用が期待される。



## 参考文献

1. Poulter, C. D. and Rilling, H. C. (1982) in *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds*, (Spurgeon, S.L. and Porter, J.W., eds) pp 161-224, John Wiley & Sons, New York.
2. Ogura, K. and Koyama, T. (1997) in *Dynamic Aspects of Natural Products Chemistry* (Ogura, K. and Sankawa, U., eds) pp. 1-23. Kodansha Press, Tokyo.
3. Tanaka, Y., Nunogaki, K., Kageyu, A., Mori, M., and Sato, Y. (1988) *J. Nat. Rubber Res.* **3**, 177-183.
4. Tanaka, Y. (1989) *J. Appl. Polym. Sci.* **44**, 1-9.
5. Ogura, K. and Koyama, T. (1998) *Chem. Rev.* **98**, 1263-1276.
6. Clarke, C. F., Tanaka, R. D., Svenson, K., Wamsley, M., Fogelman, A. M., and Edwards, P. A. (1987) *Mol. Cell. Biol.* **7**, 3138-3146.
7. Anderson, M. S., Yarger, J. G., Burck, C. L., and Poulter, C. D. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 19176-19184.
8. Fujisaki, S., Hara, H., Nishimura, Y., Horiuchi, K., and Nishino, T. (1990) *J. Biochem. (Tokyo)* **108**, 995-1000.
9. Koyama, T., Obata, S., Osabe, M., Takeshita, A., Yokoyama, K., Uchida, M., Nishino, T., and Ogura, K. (1993) *J. Biochem. (Tokyo)* **113**, 355-363.
10. Wilkin, D. J., Kutsunai, S. Y., and Edwards, P. A. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 4607-4614.
11. Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K., and Harashima, K. (1990) *J. Bacteriol.* **172**, 6704-6712.
12. Carattoli, A., Romano, N., Ballario, P., Morelli, G., and Macino, G. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 5854-5859.
13. Math, S. K., Hearst, J. E., and Poulter, C. D. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6761-6764.
14. Ohnuma, S., Suzuki, M., and Nishino, T. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 14792-14797.
15. Chen, A. and Poulter, C. D. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* **314**, 399-404.
16. Ashby, M. N. and Edwards, P. A. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 13157-13164.



17. Koike-Takeshita, A., Koyama, T., Obata, S., and Ogura, K. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 18396-18400.
18. Asai, K., Fujisaki, S., Nishimura, Y., Nishino, T., Okada, K., Nakagawa, T., Kawamukai, M., and Matsuda, H. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, 340-345.
19. Okada, K., Kamiya, Y., Zhu, X., Suzuki, K., Tanaka, K., Nakagawa, T., Matsuda, H., and Kawamukai, M. (1997) *J. Bacteriol.* **179**, 5992-5998.
20. Suzuki, K., Okada, K., Kamiya, Y., Zhu, X. F., Nakagawa, T., Kawamukai, M., and Matsuda, H. (1997) *J. Biochem. (Tokyo)* **121**, 496-505.
21. Chen, A., Kroon, P. A., and Poulter, C. D. (1994) *Protein Sci.* **3**, 600-607.
22. Ohnuma, S., Koyama, T., and Ogura, K. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 23706-23713.
23. Shimizu, N., Koyama, T., and Ogura, K. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 1578-1581.
24. Zhang, Y. W., Koyama, T., and Ogura, K. (1997) *J. Bacteriol.* **179**, 1417-1419.
25. Jiang, Y., Proteau, P., Poulter, D., and Ferro-Novick, S. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 21793-21799.
26. Kuzuguchi, T., Morita, Y., Sagami, I., Sagami, H., and Ogura, K. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 5888-5894.
27. Shimizu, N., Koyama, T., and Ogura, K. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 19476-19481.
28. Apfel, C. M., Takacs, B., Fountoulakis, M., Stieger, M., and Keck, W. (1999) *J. Bacteriol.* **181**, 483-492.
29. Sato, M., Sato, K., Nishikawa, S., Hirata, A., Kato, J., and Nakano, A. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 471-483.
30. Ohnuma, S., Hirooka, K., Hemmi, H., Ishida, C., Ohto, C., and Nishino, T. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 18831-18837.
31. Ohnuma, S., Hirooka, K., Ohto, C., and Nishino, T. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 5192-5198.
32. Ohnuma, S., Hirooka, K., Tsuruoka, N., Yano, M., Ohto, C., Nakane, H., and Nishino, T. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 26705-26713.



33. Hirooka, K., Kato, T., Matsu-ura, J., Hemmi, H., and Nishino, T. (2000) *FEBS Lett. in press*.
34. Hirooka, K., Ohnuma, S., Koike-Takeshita, A., Koyama, T., and Nishino, T. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 4520-4528.
35. Ohnuma, S. and Wang, K. (1999) *Trends Biochem. Sci.* **24**, 445-451.



## 第2章 古細菌由来ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素における生成物鎖長決定に重要なアミノ酸の同定

### 2-1 緒論

これまで数多くの *E* 型プレニルニリン酸合成酵素についてその性質が調べられてきた (1, 2)。これらの酵素はアリル性基質へのイソペンテニルニリン酸 (IPP,  $C_5$ ) のトランスの立体化学での縮合という共通の反応を触媒するが、最終生成物鎖長は酵素ごとに厳密に規定され、その生成物特異性を超えて縮合反応が起こることはない。ファルネシルニリン酸 (FPP) 合成酵素は、ジメチルアリルニリン酸 (DMAPP,  $C_5$ ) またはゲラニルニリン酸 (GPP,  $C_{10}$ ) をアリル性基質に用いて IPP を順次縮合させ、 $C_{15}$  の FPP を生成するが、それよりも長鎖の生成物を合成しない。ゲラニルゲラニルニリン酸 (GGPP) 合成酵素は、同様の縮合反応で  $C_{20}$  の GGPP を生成する。この酵素については利用可能なアリル性基質の鎖長によって、さらに 2 つのサブグループに細分される。酵母や乳類の GGPP 合成酵素は、FPP を唯一のアリル性基質とし、FPP に IPP を 1 段階縮合させる反応を触媒する。これに対して、他の GGPP 合成酵素は、DMAPP、GPP、FPP に IPP を順次縮合させることができる。しかしどのサブグループの GGPP 合成酵素も  $C_{20}$  より長鎖のプレニルニリン酸を生成することはない。どのようにして *E* 型プレニルニリン酸合成酵素は生成物鎖長を制御するのであろうか。

プレニルニリン酸合成酵素の生成物鎖長を決定する因子に関して、それまでいくつかの知見が得られていた。数種類の *E* 型長鎖プレニルニリン酸合成酵素では、基質や金属イオンの濃度のような *in vitro* の反応条件が生成物鎖長に影響することが知られていた (3-7)。一方、*in vivo* においてもプレニルニリン酸の鎖長の変化を示す結果がいくつか報告された。キノンのプレニル鎖長が、ウイルス感染で変化すること (8)、あるいは組織ごとに異なることが知られており (9)、またラット肝臓内のドリキル鎖長がガン化 (10) や老化 (11, 12) によって変化することもわかった。これらの現象が生体内における IPP や金属イオンの濃度の変化に起因することを示唆する報告もある (13, 14)。しかし、いずれの報告も中間生成物の量の変化に関するものであり、プレニルニリン酸合成酵素がどのような構造と機能で最終生成物鎖長を決定するのかを知る手がかりとはならなかった。

1987 年以降に単離された多くの *E* 型プレニルニリン酸合成酵素の遺伝子 (15-27) の配列の比較から、いくつかの保存領域が見出され (18, 20)、現在の酵素が共通の祖先型酵素から進化したことが示唆された (20)。さらに保存領域に変異を導入した酵素の解析から保存領域の機能の一部を知ることができた (27-31)。特にアスパラギン酸に富んだ 2 つのモチーフ (DDXX(X)D, X は任意のアミノ酸) のうち、最初のモチーフ (First Aspartate-Rich Motif, FARM) がアリル性基質結合部位であり、2 番目のモチーフ (Second Aspartate-Rich Motif, SARM) が IPP 結合部位であり、2 つのモチーフ内にあるアスパラギン酸のカルボキシル基が、 $Mg^{2+}$  等の 2 価金属イオンを介して基質のニリン酸基と結合することがわかった。しかし、これらの変異型酵素を用いた研究は IPP の縮合反応機構に注目したものであり、生成物鎖長制御については未解明のままで



あった。生成物鎖長が変化した *E* 型プレニル二リン酸合成酵素の変異体として、それまで酵母由来 FPP 合成酵素の変異体が報告されていた (32)。この変異型酵素は、197 位のリシンがグルタミン酸へ置換されており、野生型酵素に比べて中間生成物の GPP の生成量が増加するという性質をもっていたが、最終生成物鎖長は  $C_{15}$  のままであり、鎖長決定機構の解明につながるものではなかった。

1996 年に我々のグループが FPP 合成酵素から GGPP 合成酵素への変換に成功し、最終生成物鎖長が変化した変異型酵素が初めて得られた。この変異型酵素の解析により、1 つのアミノ酸置換が生成物特異性を変化させることが明らかとなった (33)。このことは鎖長決定機構を知る上で重要な手がかりとなったが、機構の解明にはさらに多くの生成物特異性を変化した変異型酵素を獲得し、解析することが必要である。そこで、好熱性古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius* GGPP 合成酵素 (23) から GGPP よりも長鎖生成物を合成する変異型酵素を作製することを試みた。

以前の、FPP 合成酵素から GGPP 合成酵素への変換の際には、*in vivo* での GGPP からのカロテノイド合成を利用した発現スクリーニング系を用い、ランダム変異 FPP 合成酵素ライブラリーから GGPP を生産する変異型酵素の選別を行った。しかし、この方法では GGPP よりも長鎖プレニル二リン酸を生成する変異型酵素を選別することはできない。そこで酵母の変異体を利用したスクリーニング系を構築し、ランダム変異 GGPP 合成酵素ライブラリーからの選別を試みた。

酵母 C296LH<sub>3</sub> 株はヘキサプレニル二リン酸 (HexPP) 合成酵素を欠損しており、補酵素 Q<sub>6</sub> (CoQ<sub>6</sub>) を生産できない。CoQ<sub>6</sub> は呼吸による非発酵性糖代謝に必須であるので、炭素源としてグリセロールなどの非発酵性基質しか含まない培地では、この欠損株は生育することができない (34, 35)。もし変異型 GGPP 合成酵素が HexPP を合成することができれば、それを発現している C296LH<sub>3</sub> 株はグリセロールを炭素源に用いて生育できるはずである。第 2 章では、この方法で  $C_{20}$  以上の長鎖生成物を生産する変異型 GGPP 合成酵素を獲得し、生成物鎖長決定に重要なアミノ酸を同定したことについて述べる。



## 2-2 実験方法

### 試料

酵母 HexPP 合成酵素欠損株 C296LH<sub>3</sub> ( $\alpha$  *leu2 his3 pet*) とプラスミド pG3/T1 は A. Tzagoloff 博士 (コロンビア大学) から、酵母 A451 ( $\alpha$  *can1 leu2 ura3 trp1 aro7*) 株は東北大学農学部一島研究室から、プラスミド YEpG3 $\Delta$ SpH は P. A. Edwards 博士 (カリフォルニア大学、ロサンゼルス) から、プラスミド Y-*crtE* は三沢典彦博士 (麒麟ビール株式会社) からそれぞれ頂いた。逆相 TLC プレート、LKC18 は Whatman 社から購入した。(all-*E*)-FPP、(all-*E*)-GGPP、GPP、DMAPP は東北大学反応化学研究所小倉研究室で合成されたものを使用した (23)。 $[1-^{14}\text{C}]$ IPP は Amersham 社から購入した。トリ骨髄芽球症ウイルス (avian myeloblastosis virus, AMV) 逆転写酵素は Life Science 社より購入した。他の全ての試薬は市販の特級品を使用した。

### DNA シークエンス

変異型 GGPP 合成酵素の塩基配列は Perkin Elmer 社のモデル 373 DNA シークエンサーを用いたジデオキシ法によって決定した。DNA および推定アミノ酸配列は MacMollyTetra 遺伝子解析ソフトによって解析を行った。

### プラスミドの構築

*S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素遺伝子の 5'側上流と 3'側下流の領域に新規の *Hind*III サイトを導入した。変異導入は 2 つの合成オリゴヌクレオチドプライマー (5'-AAGAGAAGCTTATGAGTTACTTTTGAC-3' と 5'-GATACAAGCTTTATTTTCTCC-3') を用いた PCR によって行った。PCR 産物を *Hind*III で消化後、得られた 1002 bp の断片を *Hind*III で切断した pBluescriptII KS+ベクターに組み込み、プラスミド pBS-GGPS を作製した。

プラスミド Y-*crtE* は酵母由来ホスホグリセロールキナーゼ遺伝子のプロモーターとターミネーターを含み、それらの間に植物病原菌 *Erwinia uredovora* 由来 GGPP 合成酵素遺伝子 *crtE* が *Hind*III サイトで挿入されている。これを *Hind*III で消化し *crtE* 遺伝子を切り出して、残りのプロモーターとターミネーターを含む部分を自己環化させて酵母用発現ベクター Y-PGK を作製した。このベクターの *Hind*III サイトに、pBS-GGPS から *Hind*III で切り出した *S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素遺伝子断片を組み込み、酵母用発現プラスミド Y-GGPS を構築した。

### GGPP 合成酵素遺伝子に対するランダム変異導入

GGPP 合成酵素遺伝子に対するランダム変異の導入は Myers らの方法に従い NaNO<sub>2</sub> 処理によって行った (36)。まず M13KO7 ヘルパーファージを利用して pBS-GGPS の一本鎖 DNA を調製し、これに対して 1 M NaNO<sub>2</sub> で 1 時間処理を行い、ランダム変異を導入した。次いで変異導入一本鎖 DNA を精製後、DNA プライマー (5'-CCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAA-3'、これは pBS-GGPS の T7 プロモーター領域にアニーリングする) を用いて AMV 逆転写酵素による反応を行い、二本鎖 DNA を



合成した。次に変異導入 GGPP 合成酵素遺伝子を *Hind*III で切り出して *Hind*III で切断した Y-PGK に組み込み、ランダム変異導入 GGPP 合成酵素遺伝子ライブラリーを作製した。

#### 酵母の形質転換と *pet* 表現型を抑制する変異型 GGPP 合成酵素の選別

酵母の形質転換は Ashby と Edwards の方法を参考にしてスフェロプラスト法で行った (25)。酵母 C296LH<sub>3</sub> を作製したランダム変異 GGPP 合成酵素ライブラリーで形質転換し、トップアガーに混合して 1 M ソルビトールを含む leu<sup>-</sup>プレートに接種して培養した。次に得られた形質転換体を YEPG (グルコースを含まない)、D (0.1%グルコースを含む)、YPD (2%グルコースを含む) プレートに接種し 30°C で 3 日間培養後、YEPG プレートで生育して D プレートで C296LH<sub>3</sub> よりも大きなコロニーを形成するクローンの選別を行った。その結果、約 1400 の形質転換体から 5 個のポジティブクローンが得られ、それらから 5 種類のプラスミド (Y-GGPSmut1、-2、-3、-4、-5) を回収した。これらについて解析を行った。

酵母用液体培地の組成を示す。プレートは 20 g/l でアガーを添加したものである。

##### leu<sup>-</sup>培地

0.17%	yeast nitrogen base without amino acids
0.5%	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
2%	glucose
0.13%	CM drop out powder

##### YPD 培地

1%	yeast extract
2%	Bacto-peptone
2%	glucose

##### D 培地

1%	yeast extract
2%	ethanol
2%	Bacto-peptone
3%	glycerol
0.1%	glucose

##### YEPG 培地

1%	yeast extract
2%	ethanol
2%	Bacto-peptone
3%	glycerol



### 酵母からの変異型 GGPP 合成酵素の調製

形質転換した酵母からの GGPP 合成酵素粗酵素抽出液の調製は伊藤らのスフェロプラスト法 (37) を参考にして行った。操作手順をここに示す。

- 1) *S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素遺伝子を保持する C296LH<sub>3</sub> 株を leu 培地に接種して 30°C で振とう培養後、集菌した (約 400 mg)。
- 2) 菌体を MilliQ 水で洗浄後、800 µl の buffer A で懸濁し、30°C で 15 分間保温した。次いで遠心分離して上清を除いた。

#### buffer A

50 mM	Tris-HCl, pH 7.5
5 mM	MgCl <sub>2</sub>
50 mM	DTT
1 M	sorbitol

- 3) 菌体を 1.2 ml の buffer B で懸濁後、0.8 mg の zymolyase 20T (生化学株式会社) を添加し、30°C で 1 時間反応させ、細胞壁を消化してスフェロプラスト化した。

#### buufer B

50 mM	Tris-HCl, pH 7.5
5 mM	MgCl <sub>2</sub>
3 mM	DTT
1 M	sorbitol

- 4) スフェロプラストを buffer B で 3 回洗浄後、1 ml の buffer C で懸濁し、超音波破碎した。

#### buffer C

1 mM	PMSF
50 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /KOH, pH 5.8
10 mM	β-mercaptoethanol
1 mM	EDTA

- 5) 55°C で 15 時間熱処理を行い、宿主由来の酵素を失活させた後、10000 x g で 10 分間遠心分離を行い、上清を粗酵素抽出液として活性測定に使用した。

### 大腸菌で変異型 GGPP 合成酵素を発現させるためのプラスミドの構築

プラスミド Y-GGPSmut1、-2、-3、-4、-5 から変異型 GGPP 合成酵素遺伝子を *Hind*III で切り出し、pBluescriptII KS+ に *Hind*III サイトで組み込み、プラスミド pBS-GGPSmut1、-2、-3、-4、-5 を構築した。



## 大腸菌からの GGPP 合成酵素の調製

形質転換した大腸菌からの GGPP 合成酵素粗酵素抽出液の調製方法をここに示す。

- 1) Sambrook らの方法に従って、プラスミド pBS-GGPSmut1、-2、-3、-4、-5 を用いて大腸菌 XL1-Blue 株を形質転換し、2x LB 液体培地 (60 µg/ml のアンピシリンを含む) に接種して 37°C で一晩振とう培養後、集菌した (38)。
- 2) 菌体を MilliQ 水で洗浄後、sonication buffer で懸濁し、超音波破碎した。

sonication buffer

50 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /KOH, pH 5.8
10 mM	β-mercaptoethanol
1 mM	EDTA

- 3) 55°C で 15 時間熱処理を行い、宿主由来の酵素を失活させた後、10000 x g で 20 分間遠心分離を行い、上清を粗酵素抽出液として活性測定に使用した。

## プレニルニリン酸合成酵素活性の測定

プレニルニリン酸合成酵素活性を次のような手順で測定した。

- 1) 以下に示す組成の assay mixture を調製した。

assay mixture (total volume 1 ml)

MgCl <sub>2</sub>	5 µmol
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /KOH, pH 5.8	10 µmol
allylic substrate	25 nmol
[1- <sup>14</sup> C]IPP (1 Ci/mol)	25 nmol
crude enzyme	a suitable amount

- 2) 55°C で一定時間反応後、急冷して反応を停止させた。
- 3) 3.5 ml の水飽和 1-ブタノールを加えて激しく攪拌後、ブタノール層を回収した。
- 4) ブタノール抽出液の放射エネルギーを液体シンチレーションカウンターで測定し、比活性を求めた。ここで酵素活性の 1 unit を 1 nmol の [1-<sup>14</sup>C]IPP を生成物中に取り込むのに要する活性と定義する。

## 生成物分析

以下の操作手順で TLC 分析を行い、生成物を同定した。

- 1) 前述に従って [1-<sup>14</sup>C]IPP を用いた酵素反応を行い、生成したプレニルニリン酸をブタノール抽出後、抽出液に窒素ガスを吹きつけて濃縮した。
- 2) 藤井らの方法に従って、得られたプレニルニリン酸を酸性ホスファターゼ処理し、ニリン酸基を加水分解した (39)。



- 3) 加水分解産物のプレノールをペンタンで抽出し、逆相 TLC 分析を行い、生成物の鎖長とその割合を調べた。プレートには LKC18 を、展開溶媒にはアセトン/水 (9:1) を用いた。標準試料はヨウ素で呈色させ、放射能の分布はバイオイメージングアナライザーシステム (BAS2000、富士フィルム) で解析した。それぞれの生成物の割合は、放射エネルギーの絶対値を生成物中に取り込まれた IPP の数で割ることで決定した。



## 2-3 結果

### 酵母の呼吸欠損株を利用した選別法の構築

*S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素において、どのアミノ酸が生成物鎖長決定に重要であるかを知るために、生成物鎖長が野生型とは異なる変異型酵素の作製を試みた。有効な発現スクリーニング系を構築できれば、化学処理で作製したランダム変異 GGPP 合成酵素ライブラリーからの選別は目的の変異型酵素獲得の有用な手段となると思われる。そこで、 $C_{20}$  よりも長鎖のプレニルリン酸を生成する変異型酵素を選別するために、酵母呼吸欠損株を利用したスクリーニング系を構築した (図 2-1)。

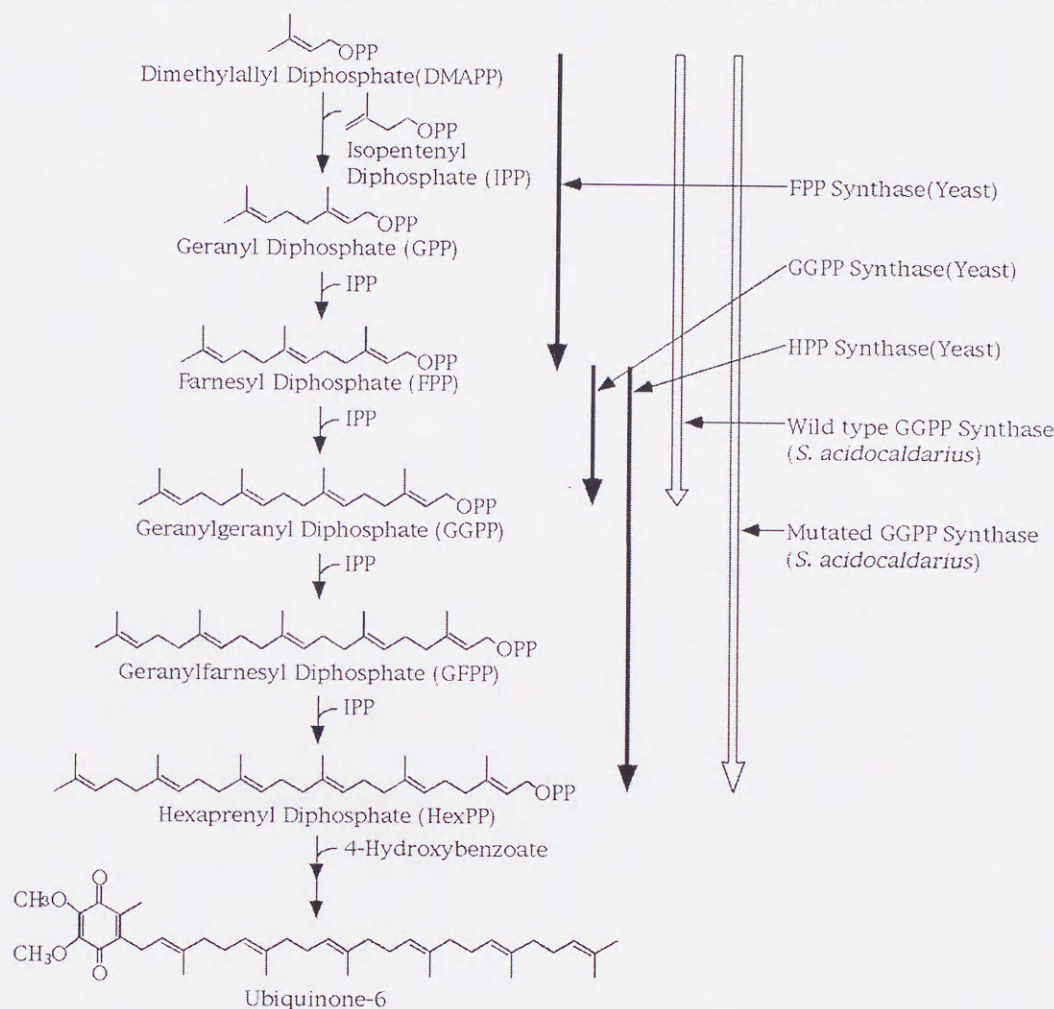


図 2-1 酵母での CoQ<sub>6</sub> 生合成

酵母 C296LH<sub>3</sub> 株は HexPP 合成酵素を欠損しており、そのためヘキサプレニル基をもつ CoQ<sub>6</sub> を生産できない。CoQ<sub>6</sub> は呼吸による非発酵性糖代謝に必須であるので、C296LH<sub>3</sub> は少量のグルコースを含む培地 (D プレート) で培養すると、野生型よりも小さなコロニーを形成し (*pet* 表現型、図 2-2B、E)、炭素源として非発酵性基質であるグリセロールしか含まない培地 (YEPG プレート) では生育することができない (図 2-2F)。この呼吸欠損株をランダム変異 GGPP 合成酵素ライブラリーで形質転換した。それから、呼吸欠損表現型を相補するクローンを選別することで HexPP を生成する変異型 GGPP 合成酵素の獲得を試みた。



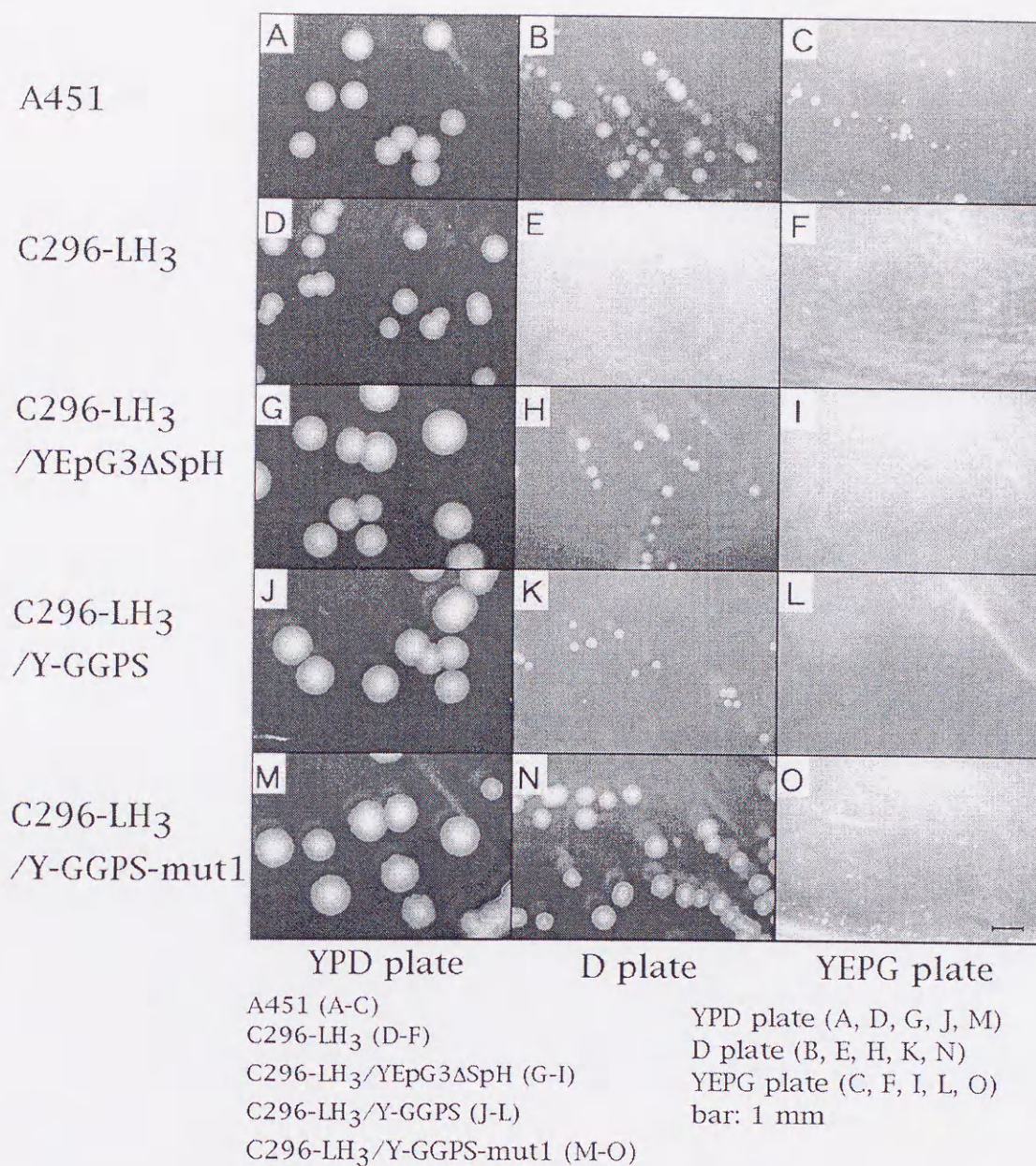


図 2-2 コロニーの大きさの比較

選別を行う前に、野生型 *S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素の発現が C296LH<sub>3</sub> 株に与える影響について調べた。少量のグルコースを含む D プレート上で、野生型 GGPP 合成酵素を発現した C296LH<sub>3</sub>/Y-GGPS (図 2-2K) は、酵母由来 HexPP 合成酵素を発現した C296LH<sub>3</sub>/YEpG3ΔSpH (図 2-2H) とプラスミドを保持しない C296LH<sub>3</sub> (図 2-2E) の中間の大きさのコロニーを形成した。一方、炭素源としてグリセロールのみを含む YEPG プレートでは、C296LH<sub>3</sub>/Y-GGPS はほとんど生育しなかった (図 2-2L)。これらの結果から、野生型 *S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素が酵母の呼吸欠損を部分的に相補できることが示された。しかし、その相補の程度は酵母の HexPP 合成酵素を発現させた場合よりも弱かった。HexPP を生成する変異型酵素はより強くこの表現型を相補すると予想されるので、この酵母の呼吸欠損株を利用したスクリーニング系が有効であると考えられた。



## ランダム変異 GGPP 合成酵素ライブラリーからの呼吸欠損表現型を抑制する変異型酵素の選別

*S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素遺伝子に対するランダム変異導入は Myers らの方法に従って行った (36)。まず GGPP 合成酵素遺伝子を含むプラスミド pBS-GGPS の一本鎖 DNA を  $\text{NaNO}_2$  で処理し、相補鎖を合成して二本鎖 DNA にした後、GGPP 合成酵素遺伝子断片を切り出して酵母用発現ベクター Y-PGK に組み込み、ランダム変異 GGPP 合成酵素ライブラリーを作製した。このライブラリーで C296LH<sub>3</sub> 株を形質転換し、機能的な補酵素 Q が発現することによって、YEPG プレートで生育し、D プレートで C296LH<sub>3</sub> よりも大きなコロニーを形成するクローンの選別を行った。その結果、約 1400 個の形質転換体から 5 個のポジティブクローン (Mutant 1-5) が得られた。図 2-2 (M-O) に Mutant 1 の各プレートにおける生育の様子を示す。Mutant 1 は YEPG プレートで生育可能であり、D プレートで C296LH<sub>3</sub>/Y-GGPS よりも大きなコロニーを形成した。他の 4 個のクローンについても同様の結果であった。

## プレニルニリン酸合成酵素活性の測定と生成物分析の結果

選別されたクローンから得られたプラスミド、Y-GGPSmut1、-2、-3、-4、-5 をそれぞれ保持する C296LH<sub>3</sub> 株から熱処理した粗酵素抽出液を調製し、それらを用いて酵素反応を行い、生成物を加水分解後、逆相 TLC で分析した (図 2-3)。

TLC 分析の結果、GGPP をアリル性基質として用いたとき、すべての変異型酵素は GGPP への IPP の 1 段階の縮合によってゲラニルファルネシルニリン酸 (GFPP、C<sub>25</sub>) を生成した (図 2-3B)。FPP をアリル性基質として用いたとき、変異型酵素ごとに異なる割合で GGPP と GFPP が得られた (図 2-3A)。一方、野生型 GGPP 合成酵素を用いた場合は C<sub>20</sub> よりも長鎖の生成物は得られなかった。

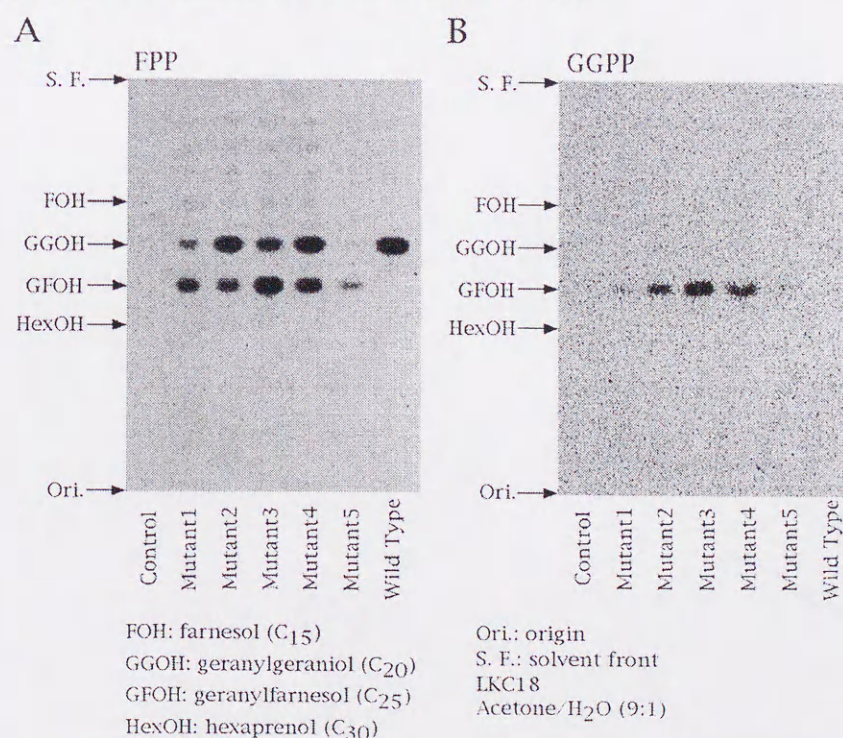


図 2-3 酵母から調製した変異型 GGPP 合成酵素の生成物分析



さらに詳細な解析のために大腸菌で変異型酵素を大量発現させた。変異型酵素遺伝子  
を大腸菌用発現ベクター pBluescriptII KS+に組み込み、プラスミド pBS-GGPSmut1、  
-2、-3、-4、-5 を構築し、それぞれで形質転換した大腸菌 XL1-Blue 株から熱処理した  
粗酵素抽出液を調製した。これらを用いて DMAPP、GPP、FPP、GGPP をアリル性基  
質として酵素反応を行い、生成物を分析した (図 2-4)。各酵素の比活性はブタノール抽  
出液の放射エネルギーを測定することによって決定した (表 2-1)。

その結果、すべての変異型酵素において  $C_{20}$  よりも長鎖のプレニル二リン酸が生成す  
ることがわかった。各変異型酵素の DMAPP、GPP、FPP に対する比活性は野生型の  
場合と大体同じで、DMAPP を用いたときに最も比活性が高かった。しかし、GGPP を  
用いたときの比活性と各アリル性基質から得られた生成物の分布は、変異型酵素ごとに  
異なっていた。Mutant 1 では DMAPP、GPP、FPP をアリル性基質に用いた場合、GFPP、  
GGPP が主生成物となった。また DMAPP を用いたときには少量の HexPP が生成した。  
Mutant 2 では GGPP が主生成物であり、全生成物の約 10%の GFPP が生成し、HexPP  
は検出されなかった。Mutant 3 と Mutant 5 は類似の傾向を示し、強い GFPP 合成活  
性と弱い HexPP 合成活性をもち、また DMAPP、GPP をアリル性基質に用いた際には  
FPP を多く生成した。DMAPP を用いた場合の GPP の割合だけが Mutant 3 と Mutant  
5 で異なっていた。Mutant 4 では GGPP が主生成物であり、GFPP の割合は全生成物  
の約 15%となった。また GPP をアリル性基質に用いた場合に FPP の生成する割合が  
高くなった。変異型酵素において生成物中の FPP の割合が増加した原因として、酵素  
内で FPP が形成された段階で、生成した FPP と添加したアリル性基質が競合して、FPP  
が酵素から解離しやすくなったことが考えられる。



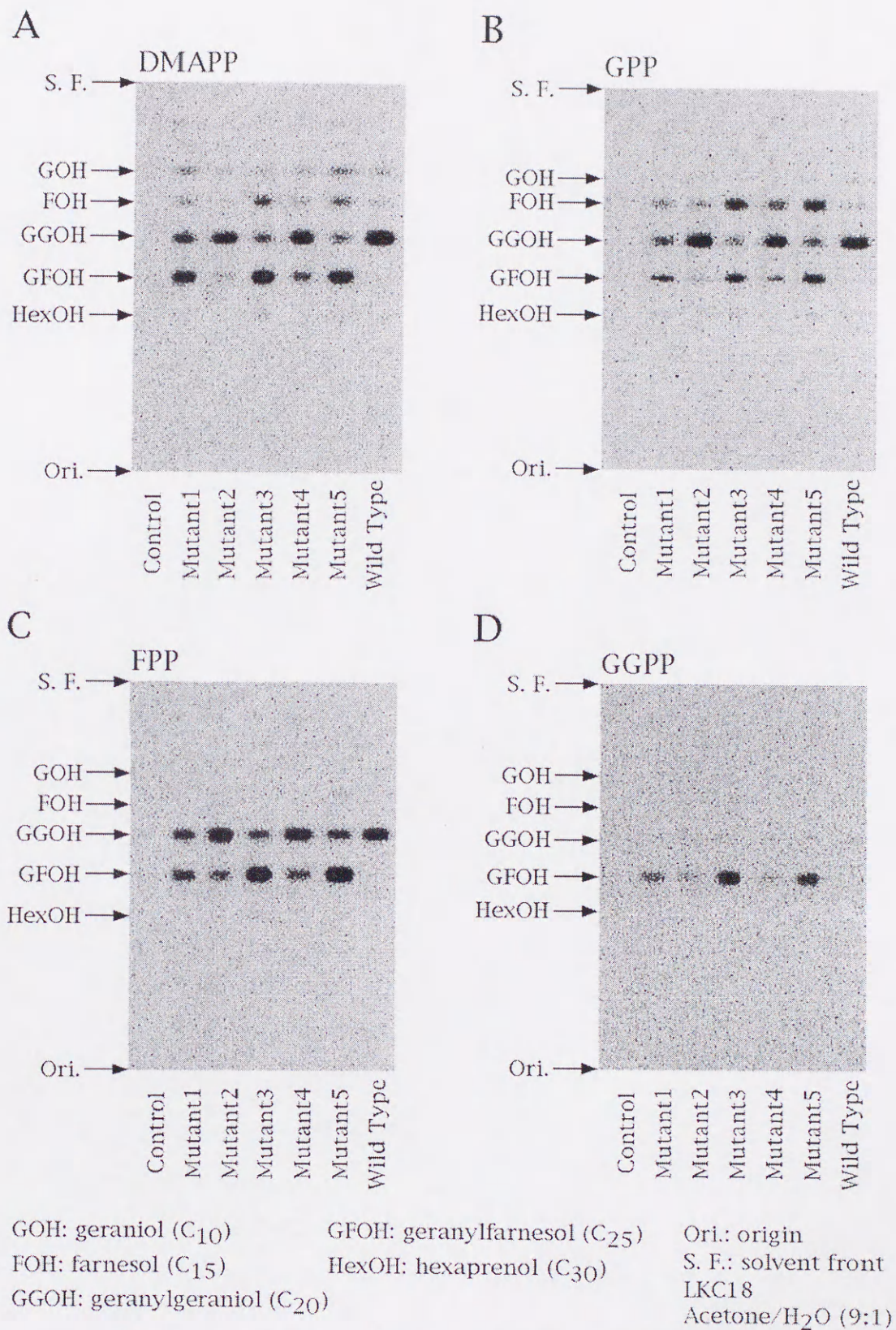


図 2-4 大腸菌から調製した変異型 GGPP 合成酵素の生成物分析



表 2-1 変異型 GGPP 合成酵素の生成物分布

Primer Substrate	Relative activity  (dpm)	Product distribution				
		GPP	FPP	GGPP	GFPP	HexPP
%						
Mutant 1						
DMAPP	31800	23.2	8.77	29.6	38.0	0.45
GPP	5260	nd <sup>a</sup>	38.8	30.9	30.4	0.02
FPP	4340	nd	nd	65.1	35.0	nd
GGPP	998	nd	nd	nd	100	nd
Mutant 2						
DMAPP	15800	1.44	0.66	89.0	8.86	nd
GPP	7050	nd	20.3	74.9	4.89	nd
FPP	6080	nd	nd	89.5	10.5	nd
GGPP	379	nd	nd	nd	100	nd
Mutant 3						
DMAPP	24900	3.40	27.4	16.6	51.6	0.92
GPP	9890	nd	64.7	9.37	24.5	1.44
FPP	7820	nd	nd	30.4	69.6	nd
GGPP	3200	nd	nd	nd	100	nd
Mutant 4						
DMAPP	16700	4.93	4.07	73.2	17.8	nd
GPP	7460	nd	38.4	51.3	10.3	nd
FPP	5650	nd	nd	85.9	14.1	nd
GGPP	551	nd	nd	nd	100	nd
Mutant 5						
DMAPP	23600	27.1	18.6	12.8	40.4	1.12
GPP	9070	nd	59.3	13.0	26.1	1.56
FPP	8960	nd	nd	32.0	68.0	nd
GGPP	2200	nd	nd	nd	100	nd
wild type						
DMAPP	13600	5.61	0.43	94.0	nd	nd
GPP	6640	nd	17.2	82.8	nd	nd
FPP	4650	nd	nd	100	nd	nd
GGPP	nd	nd	nd	nd	nd	nd

<sup>a</sup>nd, not detected.



### 生成物鎖長を決定するアミノ酸の特定

図 2-5 に各変異型 GGPP 合成酵素におけるアミノ酸置換を示す。NaNO<sub>2</sub> 処理による変異導入効率は以前の報告よりも若干低かったが (36)、すべての変異体遺伝子に数カ所の塩基置換がみつかった。Mutant 1 には 4 カ所の塩基置換があり、結果として F77S、M85I、R199K、D312N の 4 つのアミノ酸置換が生じていた。Mutant 2 には 2 カ所の塩基置換があり、F118L の 1 つのアミノ酸置換があった。Mutant 3 も 2 カ所の塩基置換があり、F77S の 1 つのアミノ酸置換があった。Mutant 4 は 4 カ所の塩基置換をもつが、そのうち 2 つはサイレント変異であり、残り 2 つは F77L と V99M の 2 つのアミノ酸置換を伴った。Mutant 5 には 2 カ所の塩基置換があり、F77S と Y101H の 2 つのアミノ酸置換があった。これらの変異の多くが芳香族アミノ酸の非芳香族アミノ酸への置換であった。特に 77 位のフェニルアラニンの置換が 5 個の変異体のうち、4 個にみられ、この位置が *S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素の生成物鎖長決定に重要であることが示された。

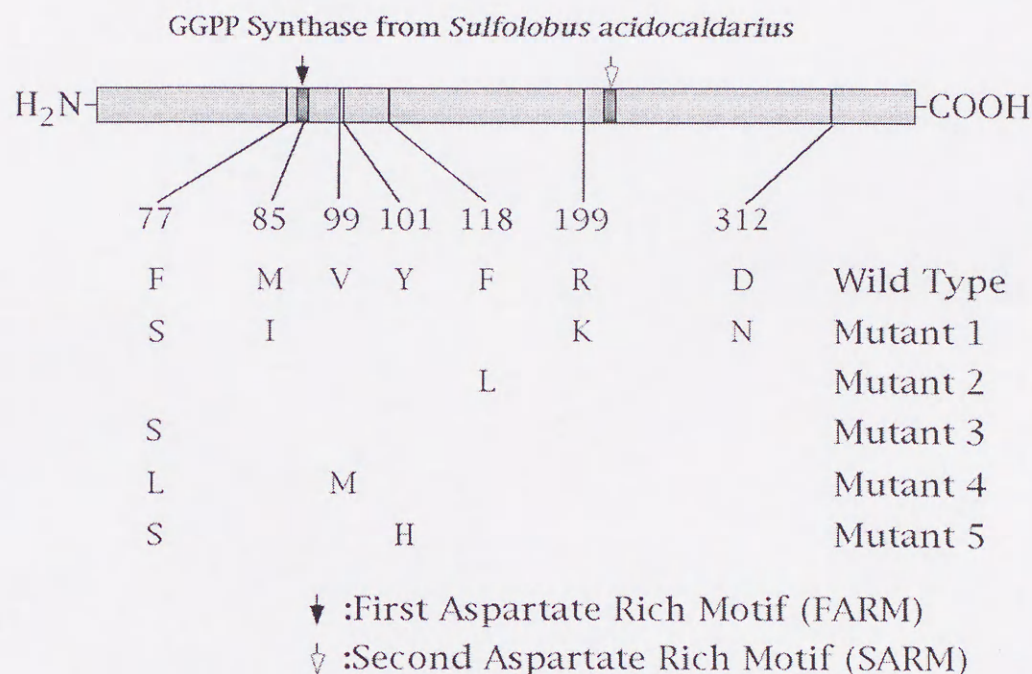


図 2-5 選別された変異型 GGPP 合成酵素のアミノ酸置換

変異型酵素は以下の塩基配列の置換をもつ。

Mutant 1	T230C, T231C (F77S), G255A (M85I), G596A (R199K), G934A (D312N)
Mutant 2	G330A (silent), T352C (F118L)
Mutant 3	T230C (F77S), G771A (silent)
Mutant 4	T229C (F77L), G295A(V99M), T426C (silent), T585C (silent)
Mutant 5	G129A (silent), T230C (F77S), T301C (Y101H)



## 2-4 考察

*E* 型プレニルニリン酸合成酵素の生成物鎖長決定機構の解明を目指し、*S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素ランダム変異ライブラリーから、 $C_{20}$  よりも長鎖を与える変異型酵素の選別を試み、そのために酵母 *C296LH<sub>3</sub>* 株による発現スクリーニング系を構築した。この株は HexPP 合成酵素を欠損しているので  $CoQ_6$  を生産せず、呼吸欠損表現型をとる。この表現型を相補するクローンを選別することによって HexPP を生産する変異型 GGPP 合成酵素の獲得を試みた。以前の研究から、 $CoQ$  合成に参与するプレニルニリン酸合成酵素はミトコンドリア内膜に結合していることが知られていた (40)。*S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素には、膜貫通領域もなく、正に荷電したアミノ酸と水酸基をもつアミノ酸で構成されるミトコンドリア輸送配列も存在しないので、*C296LH<sub>3</sub>* 株で発現させた GGPP 合成酵素は細胞質内に存在すると考えられた。そのため、たとえ変異型 GGPP 合成酵素が HexPP を生産したとしても、呼吸欠損表現型を抑制しないという恐れがあった。実際、目的のクローンが選別されたことから、変異型 GGPP 合成酵素の発現によって機能的な  $CoQ$  がミトコンドリア内で合成されることが示された。しかし、変異型 GGPP 合成酵素が細胞質内で合成したプレニルニリン酸がミトコンドリア内に輸送されるか、あるいは酵素自体がミトコンドリア内に輸送されるのかは明らかではない。

約 1400 クローンの選別から、5 個のポジティブクローンを得ることができた。これらについて変異導入部位の決定、酵素活性の測定、生成物分析を行った結果、それぞれ以下の性質をもつことがわかった。

Mutant 1 には F77S、M85I、R199K、D312N の 4 カ所のアミノ酸置換があった。Mutant 3 は F77S の置換のみで生成物鎖長が  $C_{20}$  よりも伸びることから、Mutant 1 においても F77S が生成物鎖長の延長に必須であると考えられる。Mutant 1 は DMAPP や FPP をアリル性基質に用いた場合、ほぼ等量の GFPP と GGPP を主生成物として与え、特に DMAPP がアリル性基質の場合には少量の HexPP を生成した。Mutant 2 は F118L という 1 カ所のアミノ酸置換をもち、いずれのアリル性基質を用いた場合も GFPP を生成したが、主生成物は GGPP であった。Mutant 3 は F77S という 1 カ所のアミノ酸置換があり、強い GFPP 合成活性と弱い HexPP 合成活性を示した。Mutant 4 には F77L と V99M の 2 カ所の置換がみられ、GFPP 合成活性を示した。Mutant 5 は F77S と Y101H の 2 カ所の置換があり、その生成物分布は Mutant 3 とほぼ同じだが、アリル性基質に DMAPP を用いた場合に GPP 生成量が Mutant 3 より多くなった。

このように、変異型 GGPP 合成酵素は GFPP を主に生成し、また野生型 GGPP 合成酵素を *C296LH<sub>3</sub>* 株で大量発現させると呼吸欠損表現型を部分的に抑制することから、GFPP や GGPP が  $CoQ$  の側鎖に利用されて  $CoQ_5$  や  $CoQ_4$  が生成し、 $CoQ_6$  の代わりに機能していると考えられる。キノン環へのプレニル鎖付加反応は 4-ヒドロキシ安息香酸-ポリプレニルニリン酸トランスフェラーゼによって行われるが、この酵素は基質特異性が低いので、合成された GFPP や GGPP が付加されるのであろう。*E* 型長鎖プレニルニリン酸合成酵素を異種発現させることにより酵母の  $CoQ$  のプレニル鎖長を変化させたという報告は、この予測を支持するものである (41, 42)。プレニル鎖長によって



CoQ の拡散速度が異なり、そのために NADH デヒドロゲナーゼやコハク酸デヒドロゲナーゼから  $bc_1$  複合体への電子伝達の効率が変化することが報告されている (43)。野生型 GGPP 合成酵素に比べて変異型酵素の方がより効果的に呼吸欠損表現型を抑制するのは、電子伝達の効率が、 $CoQ_4$  よりも  $CoQ_5$  の方が高いためであると考えられる。

変異型 GGPP 合成酵素の解析の結果、77 位と 118 位のフェニルアラニンが鎖長決定に重要であることがわかった。特に、獲得された 5 個の変異型酵素の 4 個に 77 位のフェニルアラニンの変異があったことは、このアミノ酸の鎖長決定における重要性を示している。中等度好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* 由来 FPP 合成酵素の生成物鎖長制御についても、我々のグループによって同様の研究が行われた (33)。この FPP 合成酵素において、GGPP 合成酵素の 77 位のフェニルアラニンに対応する 81 位のチロシンの非芳香族アミノ酸への置換によって  $C_{15}$  よりも長鎖の生成物が得られることがわかった。両方の芳香族アミノ酸ともアリル性基質結合部位である FARM から 5 残基上流にあるので、FARM から伸長したプレニル鎖がこの芳香族アミノ酸と相互作用して鎖延長反応が停止することが予想された。それまでクローニングされた *E* 型プレニルニリン酸合成酵素について FARM 周辺領域のアミノ酸配列を比較した結果、すべての FPP 合成酵素と古細菌由来の GGPP 合成酵素では FARM 上流 5 番目のアミノ酸残基が芳香族であるのに対して、 $C_{20}$  よりも長鎖のプレニルニリン酸合成酵素と古細菌以外の GGPP 合成酵素では FARM 上流 5 番目が非芳香族アミノ酸であることがわかった (図 2-6)。このことから、FPP や GGPP のような短鎖プレニルニリン酸を合成する酵素には FARM 上流 5 番目にプレニル鎖の伸長をブロックするアミノ酸残基が必要であり、それらより長鎖のプレニルニリン酸を合成する酵素ではプレニル鎖の伸長を阻害しないようにその位置は小さな残基になっていると考えられた。古細菌以外の GGPP 合成酵素ではその位置が芳香族アミノ酸ではないので、それらには伸長反応を GGPP で停止させるように働く別の機構が存在するかもしれない。1994 年に Chen らによって作成された *E* 型プレニルニリン酸合成酵素の系統樹によると、これらの酵素は 1 つの祖先型酵素から分岐しており、古細菌の GGPP 合成酵素は祖先型酵素に近く、HexPP 合成酵素は祖先型酵素から最初に分岐したと考えられている (20)。ここで述べた変異型 GGPP 合成酵素の作製は、HexPP 合成酵素が進んだ進化の道筋を古細菌の GGPP 合成酵素から人工的にたどったということができる。



		▼	FARM	
GGPS <i>S. a.</i>	74-	L	H T F T L V H D D I	--MDQDNIRR-92
GGPS <i>M. t.</i>	75-	I	H T F S L I H D D I	--MDDDEMRR-93
FPS hum	95-	L	Q A F F L V A D D I	--MDSSLTRR-113
FPS Rat	95-	L	Q A F F L V L D D I	--MDSSYTRR-113
FPS <i>A. t.</i>	86-	L	Q A Y F L V L D D I	--MDNSVTRR-104
FPS <i>S. c.</i>	91-	L	Q A Y F L V A D D M	--MDKSITRR-109
FPS <i>E. c.</i>	76-	I	H A Y S L I H D D L P A M D D D	DLRR-96
FPS <i>B. s.</i>	78-	I	H T Y S L I H D D L P S M D N D D	DLRR-98
GGPS <i>A. t.</i>	71-	I	H T M S L I H D D L P C M D N D D	DLRR-91
GGPS <i>L. a.</i>	96-	I	H T M S L I H D D L P C M D N D D	DLRR-116
GGPS <i>C. r.</i>	137-	I	H T M S L M H D D L P C M D N D D	DLRR-157
GGPS <i>N. c.</i>	173-	L	R T A S L L V D D V	--EDNSVLRR-191
GGPS <i>E. u.</i>	86-	V	H A A S L I L D D M P C M D D A K L R R	-106
GGPS <i>E. h.</i>	85-	T	H T A S L M L D D M P C M D N A E L R R	-105
GGPS <i>R. c.</i>	72-	M	H C A S L V H D D L P A F D N A D I R R	-92
GGPS <i>S. c.</i>	67-	L	H N S S L L I D D I	--EDNAPLRR-85
HexPS <i>S. c.</i>	185-	I	H T A S L L H D D V	--IDHSDTRR-203
HepPS <i>B. s.</i>	74-	I	H M A S L V H D D V	--IDDADLRR-92
OPS <i>E. c.</i>	76-	I	H T A T L L H D D V	--VDES DMRR-94

GGPS : GGPP synthase  
 FPS : FPP synthase  
 HexPS: HexPP synthase  
 HepPS: HepPP synthase  
 OPS : OPP synthase

*S. a.* : *Sulfolobus acidocaldarius*  
*M. t.* : *Methanobacterium thermoautotrophicum*  
 hum : *Homo sapiens*  
 Rat : *Rattus rattus*  
*A. t.* : *Arabidopsis thaliana*  
*S. c.* : *Saccharomyces cerevisiae*  
*E. c.* : *Escherichia coli*

*B. s.* : *Bacillus stearothermophilus*  
*L. a.* : *Lupinus albus*  
*C. r.* : *Catharanthus roseus*  
*N. c.* : *Neurospora crassa*  
*E. u.* : *Erwinia uredovora*  
*E. h.* : *Erwinia herbicola*  
*R. c.* : *Rodobacter capsulatus*

図 2-6 FARM 周辺領域のアミノ酸配列の比較



## 参考文献

1. Poulter, C. D. and Rilling, H. C. (1982) in *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds*, (Spurgeon, S.L. and Porter, J.W., eds) pp 161-224, John Wiley & Sons, New York.
2. Ogura, K. and Koyama, T. (1997) in *Dynamic Aspects of Natural Products Chemistry* (Ogura, K. and Sankawa, U., eds) pp. 1-23. Kodansha Press, Tokyo.
3. Ohnuma, S., Ito, M., Koyama, T., and Ogura, K. (1989) *Tetrahedron* **45**, 6145-6160.
4. Ohnuma, S., Koyama, T., and Ogura, K. (1989) *FEBS Lett.* **1989**, 71-74.
5. Koyama, T., Ito, M., Ohnuma, S., and Ogura, K. (1988) *Tetrahedron Lett.* **29**, 3807-3810.
6. Fujii, H., Sagami, H., Koyama, T., Ogura, K., Seto, S., Baba, T., and Allen, C. M. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **96**, 1648-1653.
7. Ohnuma, S., Koyama, T., and Ogura, K. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**, 407-412.
8. Casey, A. C. and Bliznakov, E. G. (1973) *Cancer Res.* **33**, 1183-1186.
9. Nazir, D. J. and Magar, N. G. (1964) *Biochem. J.* **90**, 268-270.
10. Eggens, I., Chojnacki, T., Kenne, L., and Dallner, G. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **751**, 355-368.
11. Sakakihara, Y. and Volpe, J. J. (1985) *J. Neurochem.* **44**, 1535-1540.
12. Crick, D. C. and Rip, J. W. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **1004**, 180-186.
13. Ohnuma, S., Koyama, T., and Ogura, K. (1992) *J. Biochem. (Tokyo)* **112**, 743-749.
14. Matsuoka, S., Sagami, H., Kurisaki, A., and Ogura, K. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 3464-3468.
15. Clarke, C. F., Tanaka, R. D., Svenson, K., Wamsley, M., Fogelman, A. M., and Edwards, P. A. (1987) *Mol. Cell. Biol.* **7**, 3138-3146.
16. Anderson, M. S., Yarger, J. G., Burck, C. L., and Poulter, C. D. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 19176-19184.



17. Fujisaki, S., Hara, H., Nishimura, Y., Horiuchi, K., and Nishino, T. (1990) *J. Biochem. (Tokyo)* **108**, 995-1000.
18. Koyama, T., Obata, S., Osabe, M., Takeshita, A., Yokoyama, K., Uchida, M., Nishino, T., and Ogura, K. (1993) *J. Biochem. (Tokyo)* **113**, 355-363.
19. Wilkin, D. J., Kutsunai, S. Y., and Edwards, P. A. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 4607-4614.
20. Chen, A., Kroon, P. A., and Poulter, C. D. (1994) *Protein Sci.* **3**, 600-607.
21. Math, S. K., Hearst, J. E., and Poulter, C. D. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6761-6764.
22. Carattoli, A., Romano, N., Ballario, P., Morelli, G., and Macino, G. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 5854-5859.
23. Ohnuma, S., Suzuki, M., and Nishino, T. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 14792-14797.
24. Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K., and Harashima, K. (1990) *J. Bacteriol.* **172**, 6704-6712.
25. Ashby, M. N. and Edwards, P. A. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 13157-13164.
26. Koike-Takeshita, A., Koyama, T., Obata, S., and Ogura, K. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 18396-18400.
27. Asai, K., Fujisaki, S., Nishimura, Y., Nishino, T., Okada, K., Nakagawa, T., Kawamukai, M., and Matsuda, H. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, 340-345.
28. Song, L. and Poulter, C. D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3044-3048.
29. Joly, A. and Edwards, P. A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 26983-26989.
30. Marrero, P. F., Poulter, C. D., and Edwards, P. A. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 21873-21878.
31. Koyama, T., Saito, K., and Ogura, K. (1994) *Can. J. Chem.* **72**, 75-79.
32. Blanchard, L. and Karst, F. (1993) *Gene (Amst.)* **125**, 185-189.
33. Ohnuma, S., Nakazawa, T., Hemmi, H., Hallberg, A.-M., Koyama, T., Ogura, K., and Nishino, T. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 10087-10095.



34. Tzagoloff, A. and Dieckmann, C. L. (1990) *Microbiol. Rev.* **54**, 211-225.
35. Tzagoloff, A., Akai, A., and Needleman, R. B. (1975) *J. Bacteriol.* **122**, 826-831.
36. Myers, R. M., Lerman, L. S., and Maniatis, T. (1985) *Science* **229**, 242-247.
37. Itoh, N., Mizumoto, K., and Kaziro, Y. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 13923-13929.
38. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
39. Fujii, H., Koyama, T., and Ogura, K. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **712**, 716-718.
40. Pennock, J. F. and Threlfall, D. R. (1983) in *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds*, (S.L. Spurgeon and J.W. Porter eds) pp 191-303, John Wiley & Sons, New York.
41. Okada, K., Suzuki, K., Kamiya, Y., Zhu, X., Fujisaki, S., Nishimura, Y., Nishino, T., Nakagawa, T., Kawamukai, M., and Matsuda, H. (1996) *Biochim. Biophys. Acta.* **1302**, 217-223.
42. Okada, K., Kainou, T., Matsuda, H., and Kawamukai, M. (1998) *FEBS Lett.* **431**, 241-244.
43. Schneider, H., Lemasters, J. J., and Hackenbrock, C. R. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 10789-10793.



### 第3章 ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素のファルネシルニリン酸合成酵素 への変換

#### 3-1 緒論

ゲラニルゲラニルニリン酸 (GGPP,  $C_{20}$ ) 合成酵素 (EC 2.5.1.29) とファルネシルニリン酸 (FPP,  $C_{15}$ ) 合成酵素 (EC 2.5.1.10) は、ともに *E* 型短鎖プレニルニリン酸合成酵素に分類され、イソペンテニルニリン酸 (IPP,  $C_5$ ) をアリル性基質へ順次縮合するという共通の反応を触媒するが、最終生成物鎖長が異なっている。GGPP 合成酵素は、ジメチルアリルニリン酸 (DMAPP,  $C_5$ )、ゲラニルニリン酸 (GPP,  $C_{10}$ )、FPP といったアリル性基質に IPP を順次縮合させ、 $C_{20}$  を生成する。これに対して、FPP 合成酵素は DMAPP あるいは GPP をアリル性基質に用い、 $C_{15}$  を生成する。1987 年以降、数多くの GGPP 合成酵素と FPP 合成酵素の遺伝子が単離された (1-14)。これらの酵素の一次配列の比較からいくつかの保存領域が見いだされ (14, 15)、現在の酵素が共通の祖先型酵素から進化したことが示唆された (15, 16)。しかし、どのようなアミノ酸の違いが FPP 合成酵素と GGPP 合成酵素との生成物特異性の違いをもたらすかは不明であった。

第2章で述べたように、*Sulfolobus acidocaldarius* GGPP 合成酵素において 77 位のフェニルアラニンが生成物鎖長決定に重要であることがわかった (17)。また *Bacillus stearothermophilus* FPP 合成酵素では、81 位のチロシンが生成物鎖長決定に重要であることが我々のグループにより明らかにされた (18)。これらの芳香族アミノ酸は、アスパラギン酸に富んだ最初のモチーフ (DDXX(XX)D、X は任意のアミノ酸、First Aspartate-Rich Motif、FARM) から 5 残基上流に位置し、非芳香族アミノ酸への置換は生成物特異性の変化を引き起こす。野生型酵素からは  $C_{15}$  あるいは  $C_{20}$  といった決められた長さの生成物しか得られないが、置換をもつ変異型酵素では、その制限を超えて縮合反応が起こり、野生型よりも長鎖の生成物が得られる。さらに我々のグループの研究により、変異型 FPP 合成酵素において導入された 81 位のアミノ酸側鎖の大きさと生成物鎖長とが反比例することがわかった (19)。一方、ヘキサプレニルニリン酸 ( $C_{30}$ ) 合成酵素、ヘプタプレニルニリン酸 ( $C_{35}$ ) 合成酵素、オクタプレニルニリン酸 ( $C_{40}$ ) 合成酵素といった *E* 型中鎖および *E* 型長鎖プレニルニリン酸合成酵素では、対応する位置にあるアミノ酸が小さな残基の非芳香族アミノ酸である (20-22)。FARM はアリル性基質結合部位であるので、FPP 合成酵素あるいは GGPP 合成酵素では FARM から伸長するプレニル鎖を 5 残基上流にある芳香族アミノ酸がブロックして  $C_{15}$  あるいは  $C_{20}$  の生成物が得られ、それらよりも生成物鎖長が長い酵素では対応する位置にある小さな残基がプレニル鎖を通過させると予想された。

FARM から 5 残基前のアミノ酸が生成物鎖長決定に重要であることはわかった。しかし、ともに FARM の 5 残基前に芳香族アミノ酸をもつ FPP 合成酵素と GGPP 合成酵素において、生成物鎖長が  $C_{15}$  あるいは  $C_{20}$  と異なるのはなぜであろうか。この生成物特異性の違いを与えるアミノ酸が存在し、またそのアミノ酸は FARM 周辺領域に位置するのであろうか。



第3章では FPP 合成酵素と GGPP 合成酵素のそれぞれがもつ鎖長決定機構を知るために、*S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素の FARM 周辺領域を 6 種類の FPP 合成酵素の対応する領域に置換して、GGPP 合成酵素から FPP 合成酵素への変換を試みた結果について述べる。



### 3-2 実験方法

#### 試料

逆相 TLC プレート LKC18 は Whatman 社から購入した。(all-*E*)-FPP、(all-*E*)-GGPP、GPP、DMAPP は東北大学反応化学研究所小倉研究室で合成されたものを使用した (6)。<sup>[1-<sup>14</sup>C]</sup>IPP は Amersham 社から購入した。他の全ての試薬は市販の特級品を使用した。プラスミド pBS-GGPS および pBS-GGPSmut3 については第 2 章で述べた (17)。

#### DNA シークエンス

変異型 GGPP 合成酵素の塩基配列は Perkin Elmer 社のモデル 373 DNA シークエンサーを用いたジデオキシ法によって確認した。

#### 変異型 GGPP 合成酵素の作製

Kunkel 法によって *S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素遺伝子に部位特異的変異を導入した (23)。GGPP 合成酵素をコードするプラスミド pBS-GGPS から dU を含む一本鎖 DNA を調製し、それを鋳型として以下の合成オリゴヌクレオチドを使って 11 種類の変異型 GGPP 合成酵素遺伝子を作製した。太字は置換された塩基を、下線は新たに導入された制限酵素部位を表す。

プラスミド    合成オリゴヌクレオチド

pGGFS-hum	oligo-hum,	5'-CATACTTTTTTCCTTGTGGCTGATGATATCATGGATC-3'
pGGFS-rat	oligo-rat,	5'-CATACTTTTTTCCTTGTGCTTGATGATATCATGGATC-3'
pGGFS-At	oligo-At,	5'-CATACTTATTTTCCTTGTGCTTGATGATATCATGGATC-3'
pGGFS-Sc	oligo-Sc,	5'-CATACTTATTTTCCTTGTGGCTGATGATATCATGGATC-3'
pGGFS-A2	oligo-A2,	5'-GTTCTTCATACTTATTCGCTTATTCATGATAGTATT-3'
pGGFS-A4	oligo-A4,	5'-GTTCTTCATACTTTTTTCGCTTATTCATGATGATATT-3'
pGGFS-S1	oligo-S1,	5'-CATACTTTTTTCCTTGTTCATGATG-3'
pGGFS-S2	oligo-S2,	5'-CATACTTATTTTCCTTGTTCATGATG-3'
pGGFS-S3	oligo-S3,	5'-CATACTGCTTTTCCTTGTTCATGATG-3'
pGGFS-S4	oligo-S4,	5'-GTGCATGATGATCTG <b>CCGGCA</b> ATGGATCAAGAT-3'
pGGFS-S5	oligo-S5,	5'-GTGCATGATGATCTT <b>CCATCG</b> ATGGATCAAGAT-3'

次いで、作製した pGGFS-A2 から dU を含む一本鎖 DNA を調製し、それを鋳型に以下の合成オリゴヌクレオチドを使って 2 種類の変異 GGPP 合成酵素遺伝子を作製した。太字は置換された塩基を、下線は新たに導入された制限酵素部位を表す。

プラスミド    合成オリゴヌクレオチド

pGGFS-Ec	oligo-Ec,	5'-ATTCATGATGATCTG <b>CCGGCA</b> ATGGATCAAGAT-3'
pGGFS-Bs	oligo-Bs,	5'-ATTCATGATGATCTT <b>CCATCG</b> ATGGATCAAGAT-3'



### 変異型 GGPP 合成酵素の調製

第 2 章で述べた方法に従って、作製したプラスミドで形質転換した大腸菌 XL1-Blue 株から熱処理した粗酵素抽出液を調製した (24, 17)。

### プレニルニリン酸合成酵素活性の測定と生成物分析

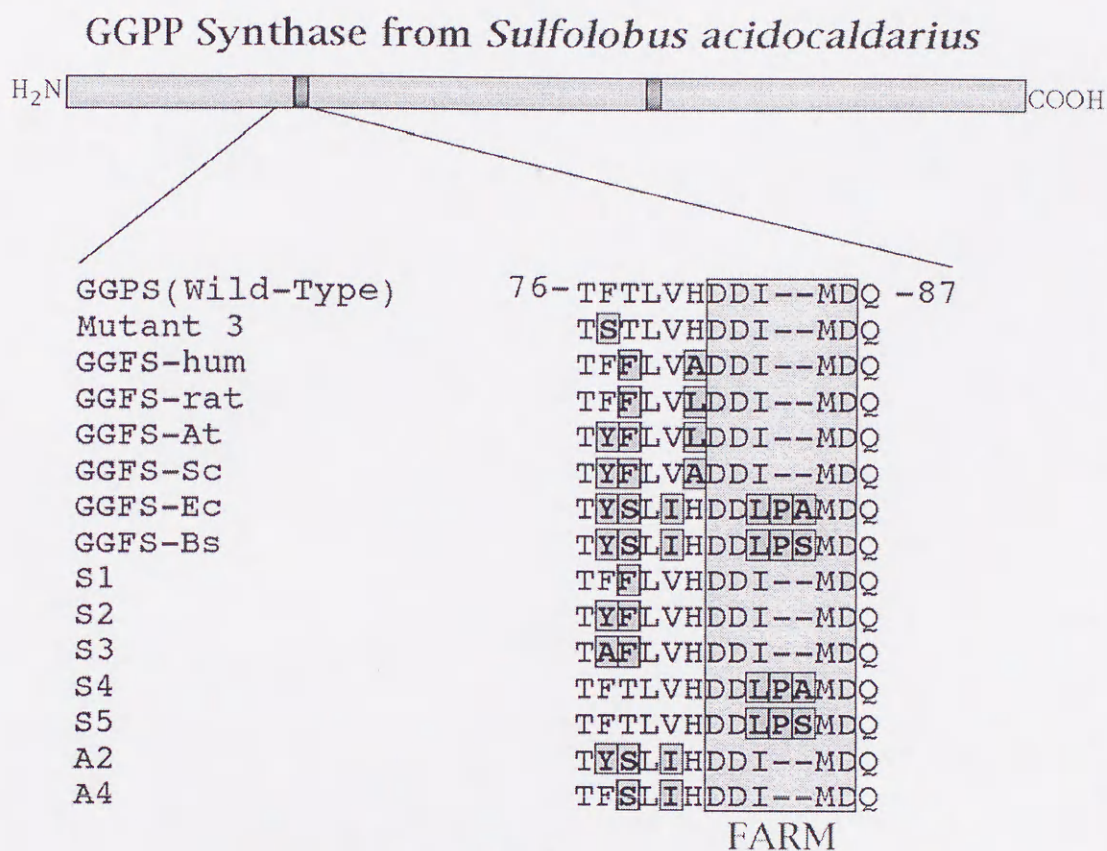
第 2 章で述べた方法に従って、プレニルニリン酸合成酵素活性を測定して生成物分析を行った (17)。



### 3-3 結果

#### 部分的に FPP 合成酵素の配列をもつ GGPP 合成酵素変異体の作製

FARM 周辺領域が生成物特異性にどのように機能しているのか、そしてどのようにして *E* 型プレニル二リン酸合成酵素が進化の過程において生成物特異性を獲得したのかを知るために、*S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素の FARM 周辺領域、すなわち 77 位から 86 位までの配列を、4 種類の真核生物（ヒト、ラット、シロイヌナズナ、酵母）、あるいは 2 種類の原核生物（大腸菌、*B. stearothermophilus*）の FPP 合成酵素の対応する領域に置換した 6 種類の変異型 GGPP 合成酵素 (GGFS-hum、GGFS-rat、GGFS-At、GGFS-Sc、GGFS-Ec、GGFS-Bs) を作製した (図 3-1)。





GPP と[1-<sup>14</sup>C]IPP を基質に用いて酵素反応を行ったとき、GGFS-Ec 以外の変異型酵素はほぼ同等の比活性を示した。GGFS-Ec はプレニルニリン酸合成酵素活性を消失していた。一方、FPP と[1-<sup>14</sup>C]IPP を基質に用いて酵素反応を行ったときの GGFS-hum、GGFS-rat、GGFS-At、GGFS-Sc、GGFS-Bs の活性は野生型酵素よりも低かった。この結果は変異導入による GGPP 合成活性の低下を示唆した (data not shown)。

このことを確かめるために、反応生成物のリン酸基を酸性ホスファターゼで加水分解後、得られたプレノールについて TLC 分析を行った (図 3-2)。25 μM DMAPP と 25 μM [1-<sup>14</sup>C]IPP を用いて酵素反応を行ったとき、GGFS-hum、GGFS-rat、GGFS-At、GGFS-Sc といった真核生物の FPP 合成酵素の配列をもつ変異型 GGPP 合成酵素の主生成物は、GGPP から FPP に著しく変化した (図 3-2A)。同様の生成物分布が GPP をアリル性基質に用いたときに観察された (図 3-2B)。しかし、これらの変異型酵素には GGPP 合成活性がわずかに残っていたので (図 3-3C)、長時間の酵素反応中に一度放出された FPP が再度酵素に結合して GGPP に変換される可能性があった。そこでこの残存活性による二次的反応が起こらないように、酵素反応を基質が十分に残っている状態で停止させ、生成物分布が反応の初期に放出される生成物を反映するようにした。GGPP 合成活性がわずかに残存したが、FARM 上流への置換によって GGPP 合成酵素から FPP 合成酵素に変換することができたので、真核生物の FPP 合成酵素において FARM 上流領域が生成物特異性を決定していることが明確に示された。

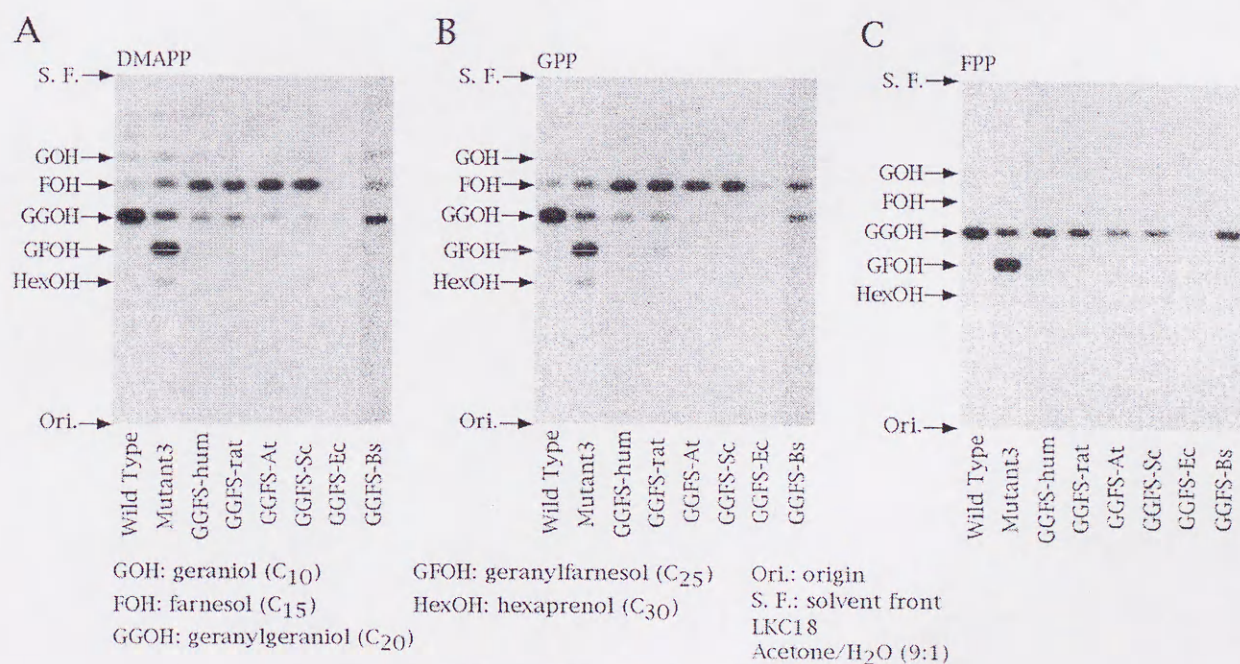


図 3-2 変異型 GGPP 合成酵素の生成物分析



一方、GGFS-Bs では野生型酵素に比べて生成物中の FPP の割合は増加したが、GGPP が相当量生成した。様々な生物から単離された FPP 合成酵素は、FARM 周辺の配列の特徴によって 2 つのグループに分類することができる。1 つは真核生物型、これを I 型 FPP 合成酵素と呼ぶことにする。このグループには、ヒト、ラット、シロイヌナズナ、酵母の FPP 合成酵素が含まれ、FARM 上流 4 番目と 5 番目に並んだ 2 つの芳香族アミノ酸が特徴的である。もう 1 つのグループは原核生物型、これを II 型 FPP 合成酵素と呼ぶことにする。このグループには大腸菌、*B. stearothermophilus* の酵素が含まれ、FARM に 2 つのアミノ酸の挿入がある (DDXXXXD)。GGFS-hum、GGFS-rat、GGFS-At、GGFS-Sc は I 型 FPP 合成酵素の配列に置換されているのに対し、GGFS-Bs は II 型 FPP 合成酵素の配列に置換されている。これらの変異型酵素の生成物分析の結果から、I 型および II 型 FPP 合成酵素とも FARM 周辺領域が生成物特異性に影響を与えるが、その鎖長制御機構は I 型と II 型の酵素で異なることが示唆された。

### I 型 FPP 合成酵素の生成物特異性に必須のアミノ酸の特定

I 型 FPP 合成酵素において生成物特異性を与えるのに必須のアミノ酸を特定するために、さらに 3 種類の変異型 GGPP 合成酵素を作製し (S1、S2、S3) (図 3-1)、その生成物を分析した (図 3-3)。S1 は T78F という 1 つの置換を、S2 は F77Y、T78F という 2 つの置換を含む。したがって、これらの酵素は FARM 上流の 4 番目と 5 番目に隣接した 2 つの芳香族アミノ酸をもつ。25  $\mu$ M DMAPP と 25  $\mu$ M [1- $^{14}$ C]IPP を用いて酵素反応を行ったとき、これらの酵素の主生成物はともに FPP であり、生成物分布は GGFS-hum、GGFS-rat、GGFS-At、GGFS-Sc の場合と同じであった (図 3-3A)。GPP、FPP をアリル性基質に用いた場合も生成物分布に変化はみられなかった (図 3-3B、C)。これらの結果から、81 位のヒスチジンの置換は鎖長決定に影響しないことがわかった。S3 は 77 位がアラニン、78 位がフェニルアラニンであるが、GGPP よりも長鎖の生成物を与えた。また野生型酵素は 77 位がフェニルアラニン、78 位がトレオニンであり、FPP が主生成物とはならない。これらの結果をあわせて、FARM 上流の 4 番目と 5 番目に隣接して 2 つの芳香族アミノ酸 (Phe/Tyr と Phe) が存在することが FPP 生成の段階で伸長反応を停止させるのに必要十分であることが断定できた。

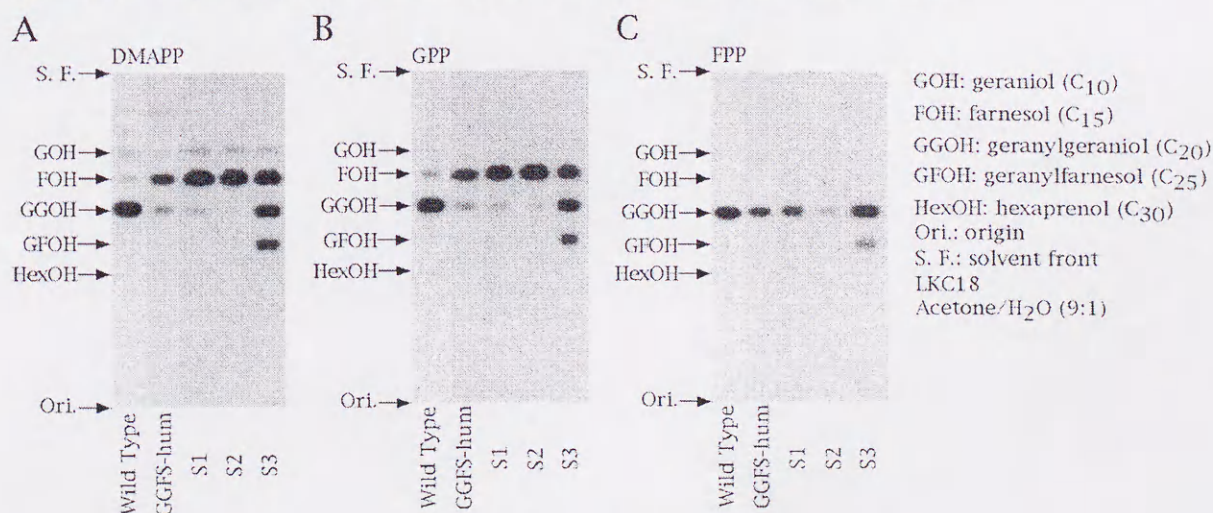


図 3-3 変異型 GGPP 合成酵素の生成物分析



## II 型 FPP 合成酵素の生成物特異性に必須のアミノ酸の特定

I 型 FPP 合成酵素では FARM 上流の 4 番目と 5 番目の隣接した 2 つの芳香族アミノ酸が生成物特異性を決めることがわかったが、II 型 FPP 合成酵素には FARM 上流の 4 番目に芳香族アミノ酸は存在しない。したがって、鎖長決定に寄与するアミノ酸が、I 型酵素と II 型酵素で異なっていると考えられる。そこで II 型 FPP 合成酵素における鎖長決定機構を調べるために、4 種類の GGPP 合成酵素変異体を作製し (A2、A4、S4、S5) (図 3-1)、その生成物を分析した (図 3-4)。

A2 には FARM 上流に F77Y、T78S、V80I の 3 つの変異が存在し、FARM 内への 2 つのアミノ酸の挿入はない。この変異型酵素の主生成物は GGPP であったが、生成物中の FPP の割合は野生型に比べてわずかに増加した。25  $\mu$ M DMAPP と 25  $\mu$ M [1- $^{14}$ C]IPP を用いて酵素反応を行ったとき、A2 と野生型から得られた生成物における FPP の占める割合は、それぞれ 8.85%、2.20%であった (図 3-4A)。しかし、A2 の生成物中の FPP の割合は、GGFS-Bs の場合 (30.4%) に比べるとはるかに少ない。また、A4 には FARM の上流に T78S、V80I の 2 つの変異があり FARM に 2 個のアミノ酸は挿入されていないが、この変異型酵素は野生型と同じ生成物分布を示した。これらの結果から、FARM 上流 5 番目へのチロシンの導入によって FPP 生成比率がわずかに増加し、主生成物を FPP にするためにはさらに別のアミノ酸置換が必要であることがわかった。

S4 と S5 は 84 位と 85 位の間への 2 つのアミノ酸の挿入と、I84L の変異をもつ。25  $\mu$ M のアリル性基質と 25  $\mu$ M [1- $^{14}$ C]IPP を用いた酵素反応において、これらの変異型酵素の生成物中の FPP の割合は野生型酵素よりもわずかに増加した。

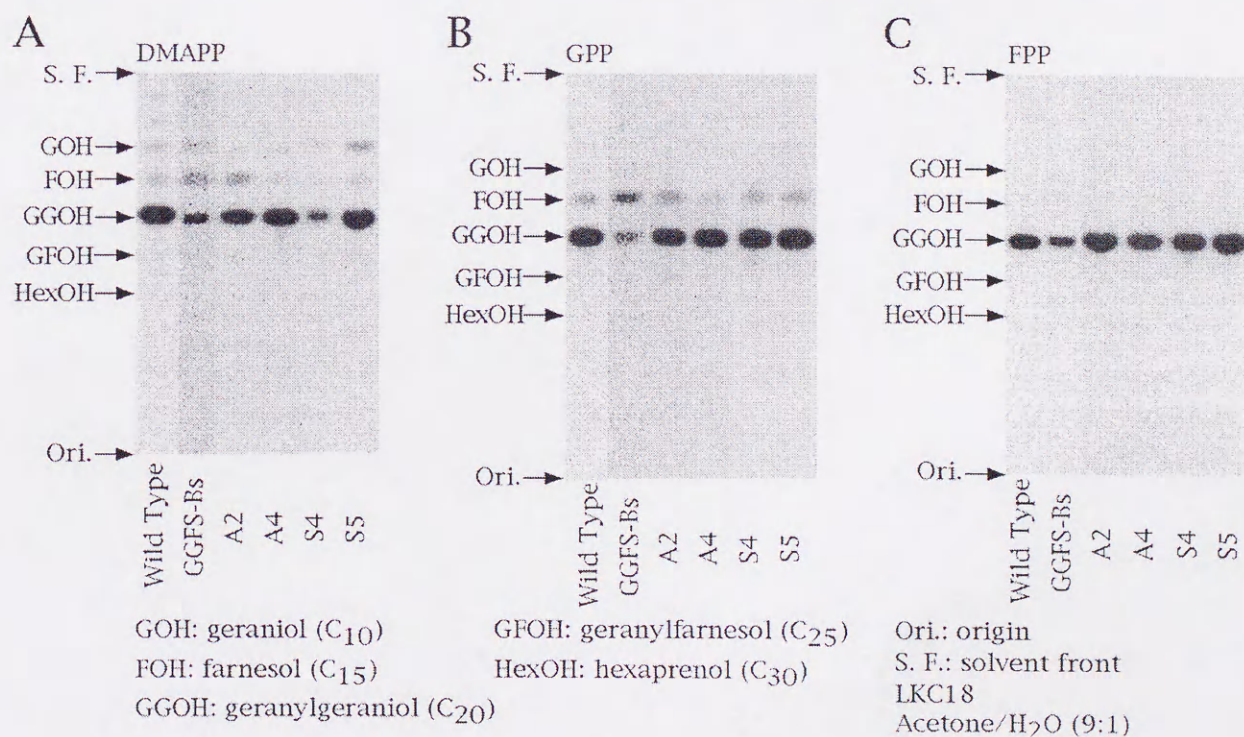


図 3-4 変異型 GGPP 合成酵素の生成物分析



### 生成物鎖長に対する基質濃度の効果

プレニル二リン酸合成酵素の *in vitro* での反応において、基質や金属イオンの濃度が生成物分布に影響するということが以前に報告されているが (25-28)、この現象は金属イオンに配位する酵素と基質の親和性が生成物鎖長に反映することを示唆している (26, 27)。また我々のグループの研究から、170 位から 173 位までの間に変異を導入した *S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素では、低濃度の IPP あるいは高濃度のアリル性基質の存在下での反応によって、野生型酵素に比べて短鎖の中間生成物量が増加することがわかった (29)。そこで、今回作製した変異型 GGPP 合成酵素の生成物分布が反応溶液中の基質濃度に依存して変化するか否かについて調べた (表 3-1)。

調べた基質濃度の範囲において、野生型酵素の生成物分布は大きく変化せず、常に GGPP が主生成物となった。GGFS-hum、GGFS-rat、GGFS-At、GGFS-Sc、S1、S2 に関して、IPP 濃度の増加あるいは GPP 濃度の減少に伴い、FPP に対する GGPP の割合がわずかに増加したが、依然 FPP が主生成物となった。

これに対して、GGFS-Bs、S4、S5 の生成物分布は基質濃度の変化に伴い著しく変化した。GGFS-Bs では、生成物中の FPP の割合は IPP 濃度に依存するようにみえる。例えば、125  $\mu$ M IPP を用いたときの FPP の割合は 54.4%であるのに対して、5  $\mu$ M IPP を用いたときの FPP の割合は 100%となった。したがって、反応条件を限定すれば FARM 周辺領域の II 型 FPP 合成酵素の配列への置換によって GGPP 合成酵素が FPP 合成酵素に変換されたと考えることができる。図 3-4 で示すように、25  $\mu$ M GPP と 25  $\mu$ M IPP という濃度条件では、S4、S5 の生成物分布は野生型酵素のものとほとんど差はみられなかった。ところが、基質濃度を变化させた場合、これらの変異型酵素と野生型酵素の生成物分布は明確に異なっていた。125  $\mu$ M GPP と 25  $\mu$ M IPP という濃度条件において生成物中の FPP の割合は、S4 (23.0%)、S5 (15.3%) の方が野生型酵素 (5.41%) よりも多くなった。同様の傾向が 25  $\mu$ M GPP と 5  $\mu$ M IPP を用いた場合に観察された。これらの結果から、FARM 内へのアミノ酸の挿入自体が基質濃度に依存して FPP を形成するように働くことが示された。A2 についても生成物中の FPP の割合は基質濃度に依存して変化することがわかった。しかし、その効果は S4、S5 で観察されたよりも弱かった。一方、T78S と V81I の 2 つの変異をもつ A4 の生成物分布は基質濃度にほとんど影響されなかった。以上の結果をあわせて、II 型 FPP 合成酵素が FPP が形成された段階で伸長反応を停止させるには、FARM 上流の 5 番目のチロシンと FARM に挿入されている 2 個のアミノ酸が必要であることがわかった。ただし、これらの変異導入だけでは FPP 合成酵素への変換は不十分で、他にも鎖長を決定している因子が存在することが示唆される。



表 3-1 基質濃度が生成物分布に与える影響

Enzyme	Substrate		Products			
	GPP	IPP	FPP	GGPP	GFPP	HexPP
	$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$		%		
Wild type	125	25	5.41	94.6	ND	ND
	25	125	3.83	96.2	ND	ND
	25	25	4.88	95.1	ND	ND
	5	25	2.44	97.6	ND	ND
	25	5	5.66	94.3	ND	ND
Mutant 3	125	25	52.9	11.2	34.2	1.65
	25	125	34.1	12.3	52.0	1.68
	25	25	24.4	16.9	56.9	1.73
	5	25	10.6	8.88	78.6	1.89
	25	5	13.7	12.5	72.0	1.75
GGFS-hum	125	25	98.6	1.40	ND	ND
	25	125	93.2	6.41	0.36	ND
	25	25	95.6	4.41	ND	ND
	5	25	81.9	16.6	1.48	ND
	25	5	97.2	2.85	ND	ND
GGFS-rat	125	25	98.3	1.66	ND	ND
	25	125	91.4	6.18	1.84	0.57
	25	25	94.2	4.72	1.11	ND
	5	25	81.4	17.0	1.59	ND
	25	5	96.5	3.49	ND	ND
GGFS-At	125	25	99.9	0.14	ND	ND
	25	125	98.7	1.31	ND	ND
	25	25	99.5	0.47	ND	ND
	5	25	96.0	3.97	ND	ND
	25	5	99.0	1.04	ND	ND
GGFS-Sc	125	25	99.9	0.09	ND	ND
	25	125	98.2	1.76	ND	ND
	25	25	99.2	0.83	ND	ND
	5	25	95.1	4.89	ND	ND
	25	5	98.8	0.62	0.55	ND
GGFS-Bs	125	25	79.9	20.1	ND	ND
	25	125	54.4	45.6	ND	ND
	25	25	73.7	26.6	ND	ND
	5	25	74.4	25.6	ND	ND
	25	5	100	ND	ND	ND
S4	125	25	23.0	77.0	ND	ND
	25	125	7.74	92.3	ND	ND
	25	25	5.61	94.4	ND	ND
	5	25	7.80	92.2	ND	ND
	25	5	28.0	72.0	ND	ND
S5	125	25	15.3	84.8	ND	ND
	25	125	3.73	96.3	ND	ND
	25	25	4.83	95.2	ND	ND
	5	25	3.23	96.8	ND	ND
	25	5	16.7	83.3	ND	ND
A2	125	25	21.8	77.6	0.61	ND
	25	125	19.3	79.1	1.17	0.46
	25	25	10.8	88.5	0.70	ND
	5	25	7.71	91.0	1.26	ND
	25	5	22.3	77.1	0.60	ND
A4	125	25	5.44	94.4	0.21	ND
	25	125	3.46	96.1	0.47	ND
	25	25	1.79	98.0	0.22	ND
	5	25	2.08	97.3	0.59	ND
	25	5	4.27	95.7	ND	ND

HexPP: hexaprenyl diphosphate, ND: not detected.



### 3-4 考察

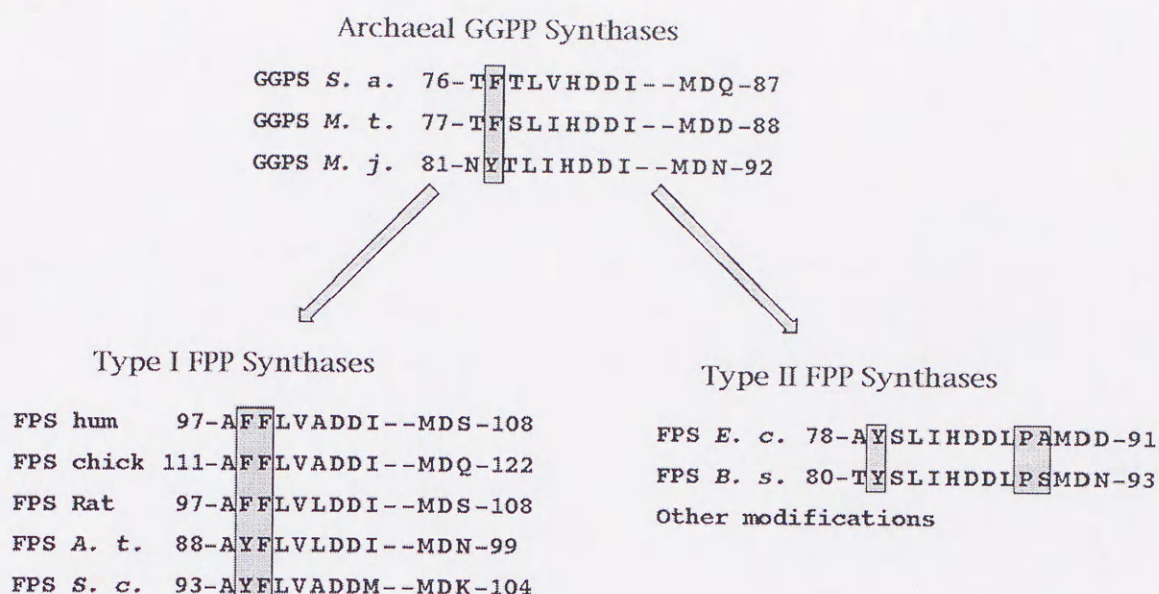
*S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素の FARM 周辺領域を FPP 合成酵素の対応する領域に置換することによって、この酵素を FPP 合成酵素に変換することに成功した。さらに FPP 合成酵素への変換に必須のアミノ酸置換を調べた結果、2 通りの方法で FPP 合成活性を発現させることが可能であることがわかった。1 つは、FARM 上流の 4 番目のアミノ酸を芳香族アミノ酸に置換して、FARM 上流の 4 番目と 5 番目に隣接した 2 つの芳香族アミノ酸を導入することによって I 型 FPP 合成酵素に変換する方法である。もう 1 つは、FARM 上流 5 番目にチロシンを導入してさらに FARM に 2 個のアミノ酸を挿入することによって、II 型 FPP 合成酵素に変換する方法である。現在の E 型プレニルニリン酸合成酵素は 1 つの祖先型酵素から進化しており、古細菌の GGPP 合成酵素は祖先型酵素に近いと考えられている (15)。進化の過程において I 型 FPP 合成酵素と II 型 FPP 合成酵素は、ともに古細菌の GGPP 合成酵素に類似の祖先型酵素から、ここで行ったようなアミノ酸置換を伴って分岐したのであろう。(図 3-5A)。古細菌の GGPP 合成酵素の FPP 合成酵素への変換は、FPP 合成酵素の進化の道筋を人工的にたどったといえるのではないであろうか。ただし、II 型 FPP 合成酵素への変換に関して、ここで示した変異導入だけでは十分な FPP 合成活性を得ることはできなかったので、完全に FPP 合成酵素に変換するには他の修飾が必要であると考えられる。

*S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素と *B. stearothermophilus* FPP 合成酵素において、FARM 上流 5 番目を小さな残基のアミノ酸へ置換することにより生成物鎖長が野生型酵素よりも長くなることをすでに述べた (17, 18)。これらの結果とこの章の結果とをあわせて、E 型プレニルニリン酸合成酵素の生成物鎖長は、FARM の 5 残基前から FARM 末端までの領域によって制御されると考えられる。そこで、この領域を鎖長決定 (Chain Length Determination, CLD) 領域と名付けた (図 3-5B)。

Tarshis らによって決定されたヒナドリ由来 FPP 合成酵素の三次元立体構造によると FARM 周辺の領域は  $\alpha$ -ヘリックスを形成しており、FARM の最初のアスパラギン酸 (Asp-117) と FARM 上流の 4 番目、5 番目の 2 つのフェニルアラニンとの間の距離は約 10-12 Å である (30) (図 3-6)。この距離は FPP の炭化水素の鎖長とほぼ同じである。また、1997 年に Tarshis らは、これら 2 つのフェニルアラニンを小さな残基のアミノ酸に置換した変異型酵素が、 $C_{30}$ - $C_{45}$  を主生成物に、 $C_{45}$  以上の生成物を与えることを報告した (31)。これらの結果は 2 つのフェニルアラニンがプレニル鎖の伸長を直接ブロックすることを強く支持している。



A



B

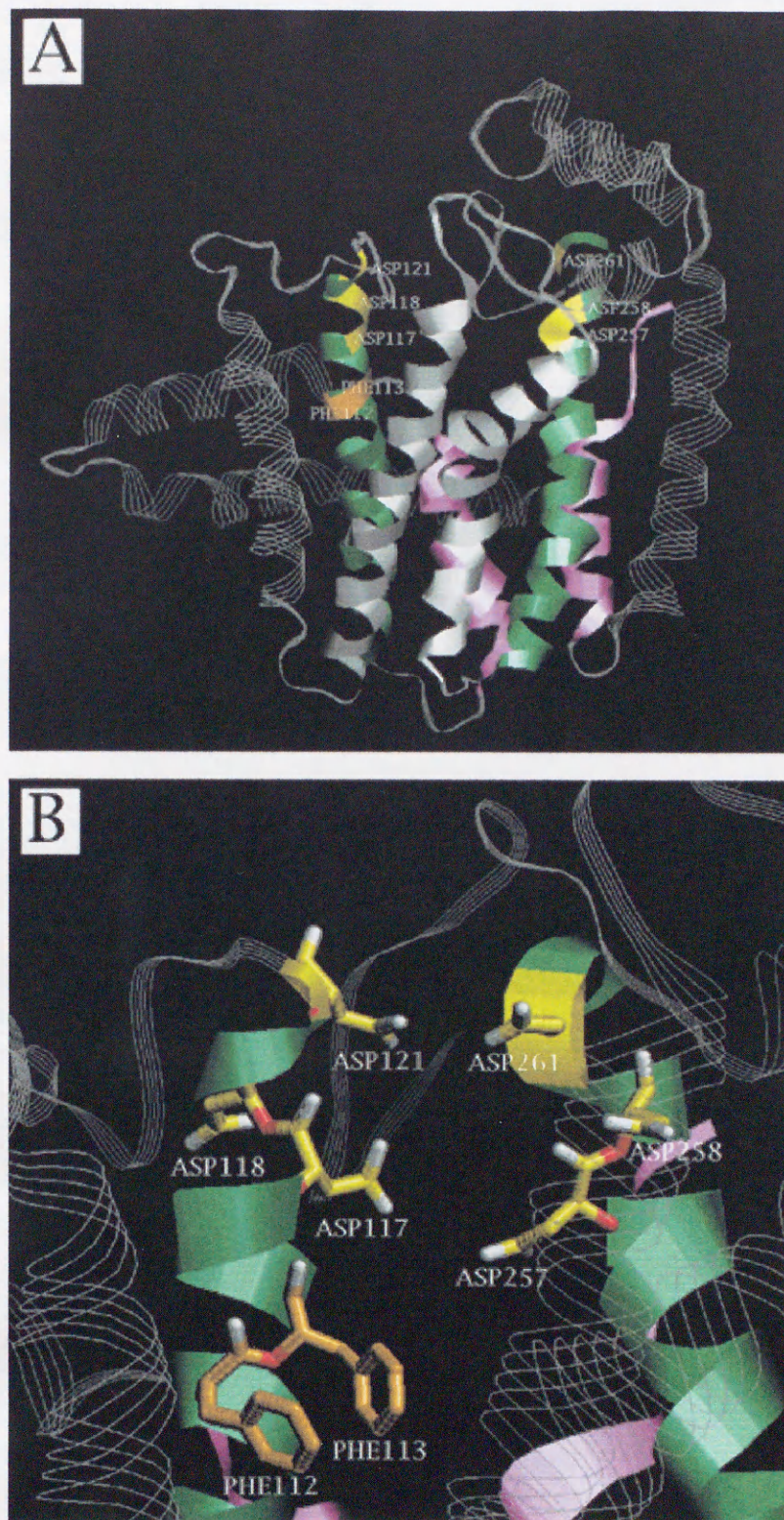
		CLD region	
GGPS <i>S. a.</i>	74	LHTFTLVHDDI--MDQDNIRR-92	
GGPS <i>M. t.</i>	75	IHTFSLIHDDI--MDDEMRR-93	
GGPS <i>M. j.</i>	79	IHNNTLIHDDI--MDNDDERR-97	
FPS <i>hum</i>	95	LQAFFLVADDI--MDSSTLRR-113	
FPS <i>Rat</i>	95	LQAFFLVLDI--MDSSTYTRR-113	
FPS <i>A. t.</i>	86	LQAYFLVLDDI--MDNSVTRR-104	
FPS <i>S. c.</i>	91	LQAYFLVADDM--MDKSITRR-109	
FPS <i>E. c.</i>	76	IHAYSLIHDDLPAMD DDDLRR-96	
FPS <i>B. s.</i>	78	IHTYSLIHDDLPMD NDDLRR-98	
GGPS <i>A. t.</i>	71	IHTMSLIHDDLPMD NDDLRR-91	
GGPS <i>L. a.</i>	96	IHTMSLIHDDLPMD NDDLRR-116	
GGPS <i>C. r.</i>	137	IHTMSLMHDDLPMD NDDLRR-157	
GGPS <i>N. c.</i>	173	LRTASLLVDDV--EDNSVLRR-191	
GGPS <i>E. u.</i>	86	VHAASLILDDMPMD DAKLRR-106	
GGPS <i>E. h.</i>	85	THTASLMLDDMPMD NAELRR-105	
GGPS <i>R. c.</i>	72	MHCASLVHDDLPADF NADIRR-92	
GGPS <i>S. c.</i>	67	LHNSLLIDDI--EDNAPLRR-85	
HexPS <i>S. c.</i>	185	IHTASLLHDDV--IDHSDTRR-203	
HepPS <i>B. s.</i>	74	IHMASLVHDDV--IDDADLRR-92	
OPS <i>E. c.</i>	76	IHTATLLHDDV--VDES DMRR-94	

FARM

GGPS: GGPP synthase	<i>S. a.</i> : <i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	<i>B. s.</i> : <i>Bacillus stearothermophilus</i>
FPS: FPP synthase	<i>M. t.</i> : <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	<i>L. a.</i> : <i>Lupinus albus</i>
HexPS: HexPP synthase	<i>M. j.</i> : <i>Methanococcus jannaschii</i>	<i>C. r.</i> : <i>Catharanthus roseus</i>
HepPS: HepPP synthase	<i>hum</i> : <i>Homo sapiens</i>	<i>N. c.</i> : <i>Neurospora crassa</i>
OPS: OPP synthase	<i>Rat</i> : <i>Rattus rattus</i>	<i>E. u.</i> : <i>Erwinia uredovora</i>
	<i>A. t.</i> : <i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>E. h.</i> : <i>Erwinia herbicola</i>
	<i>S. c.</i> : <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>R. c.</i> : <i>Rodobacter capsulatus</i>
	<i>E. c.</i> : <i>Escherichia coli</i>	

図 3-5 GGPP 合成酵素から FPP 合成酵素への進化の仮説 (A) と生成物鎖長決定領域 (B)





Tarshis, L. C. et al.,  
*Biochemistry* (1994) 33,  
 10871-10877

図 3-6 ヒナドリ由来 FPP 合成酵素の全体の立体構造 (A) と FARM 周辺領域の立体構造 (B)



## 参考文献

1. Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K., and Harashima, K. (1990) *J. Bacteriol.* **172**, 6704-6712.
2. Carattoli, A., Romano, N., Ballario, P., Morelli, G., and Macino, G. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 5854-5859.
3. Michalowski, C. B., Löffelhardt, W., and Bohnert, H. J. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 11866-11870.
4. Kuntz, M., Römer, S., Suire, C., Hugueney, P., Weil, J. H., Schantz, R., and Camara, B. (1992) *Plant J.* **2**, 25-34.
5. Math, S. K., Hearst, J. E., and Poulter, C. D. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6761-6764.
6. Ohnuma, S., Suzuki, M., and Nishino, T. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 14792-14797.
7. Chen, A. and Poulter, C. D. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* **314**, 399-404.
8. Hundle, B., Alberti, M., Nievelstein, V., Beyer, P., Kleinig, H., Armstrong, G. A., Burke, D. H., and Hearst, J. E. (1994) *Mol. Gen. Genet.* **245**, 406-416.
9. Jiang, Y., Proteau, P., Poulter, C. D., and Ferro-Novick, S. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 21793-21799.
10. Clarke, C. F., Tanaka, R. D., Svenson, K., Wamsley, M., Fogelman, A. M., and Edwards, P. A. (1987) *Mol. Cell. Biol.* **7**, 3138-3146.
11. Anderson, M. S., Yarger, J. G., Burck, C. L., and Poulter, C. D. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 19176-19184.
12. Fujisaki, S., Hara, H., Nishimura, Y., Horiuchi, K., and Nishino, T. (1990) *J. Biochem. (Tokyo)* **108**, 995-1000.
13. Wilkin, D. J., Kutsunai, S. Y., and Edwards, P. A. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 4607-4614.
14. Koyama, T., Obata, S., Osabe, M., Takeshita, A., Yokoyama, K., Uchida, M., Nishino, T., and Ogura, K. (1993) *J. Biochem. (Tokyo)* **113**, 355-363.
15. Chen, A., Kroon, P. A., and Poulter, C. D. (1994) *Protein Sci.* **3**, 600-607.
16. Chen, A. and Poulter, C. D. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 11002-11007.



17. Ohnuma, S., Hirooka, K., Hemmi, H., Ishida, C., Ohto, C., and Nishino, T. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 18831-18837.
18. Ohnuma, S., Nakazawa, T., Hemmi, H., Hallberg, A.-M., Koyama, T., Ogura, K., and Nishino, T. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 10087-10095.
19. Ohnuma, S., Narita, K., Nakazawa, T., Ishida, C., Takeuchi, Y., Ohto, C., and Nishino, T. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 30748-30754.
20. Ashby, M. N. and Edwards, P. A. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 13157-13164.
21. Koike-Takeshita, A., Koyama, T., Obata, S., and Ogura, K. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 18396-18400.
22. Asai, K., Fujisaki, S., Nishimura, Y., Nishino, T., Okada, K., Nakagawa, T., Kawamukai, M., and Matsuda, H. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, 340-345.
23. Kunkel, T. A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 488-492.
24. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
25. Fujii, H., Sagami, H., Koyama, T., Ogura, K., Seto, S., Baba, T., and Allen, C. M. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **96**, 1648-1653.
26. Ohnuma, S., Koyama, T., and Ogura, K. (1992) *J. Biochem. (Tokyo)* **112**, 743-749.
27. Matsuoka, S., Sagami, H., Kurisaki, A., and Ogura, K. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 3464-3468.
28. Tachibana, A., Tanaka, T., Taniguchi, M., and Oi, S. (1993) *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 1129-1133.
29. Ohnuma, S., Hemmi, H., Ohto, C., Nakane, H., and Nishino, T. (1997) *J. Biochem. (Tokyo)* **121**, 696-704.
30. Tarshis, L. C., Yan, M., Poulter, C. D., and Sacchettini, J. C. (1994) *Biochemistry* **33**, 10871-10877.
31. Tarshis, L. C., Proteau, P. J., Kellogg, B. A., Sacchettini, J. C., and Poulter, C. D. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 15018-15023.



## 第4章 短鎖プレニルニリン酸合成酵素の長鎖プレニルニリン酸合成酵素への 改変

### 4-1 緒論

プレニルニリン酸合成酵素は天然に存在する 20000 種以上のイソプレノイド化合物の生合成に不可欠であり、幅広いファミリーを構成している。これらの酵素はアリル性基質へのイソペンテニルニリン酸 (IPP、 $C_5$ ) の縮合という共通の反応を触媒するが、形成される生成物の二重結合がトランス (*E*) かシス (*Z*) かによって大きく 2 つのグループに分類される (1)。*Z* 型プレニルニリン酸合成酵素の生成物は糖輸送脂質の前駆体あるいは天然ゴムといった限られた範囲にしか利用されていないのに対して、*E* 型プレニルニリン酸合成酵素の生成物には  $C_{10}$  から  $C_{3500}$  近くまで様々な鎖長が存在し、それらからは極めて多彩な生理活性物質が生合成される (図 4-1)。

植物に存在するゲラニルニリン酸 (GPP、 $C_{10}$ ) 合成酵素は、ジメチルアリルニリン酸 (DMAPP、 $C_5$ ) への IPP の 1 段階の縮合反応を触媒して GPP を与え (2)、この化合物からモノテルペンが生合成される (3)。ファルネシルニリン酸 (FPP、 $C_{15}$ ) 合成酵素は DMAPP に 2 分子の IPP を順次縮合させ FPP を最終生成物として生成し、コレステロールをはじめとするステロイド、ファルネシル化タンパク質、セスキテルペン等の生合成において中心的な役割を果たしている。ゲラニルゲラニルニリン酸 (GGPP、 $C_{20}$ ) 合成酵素は、アリル性基質に IPP を順次付加して  $C_{20}$  の両親媒性分子である GGPP を生成するが、利用可能なアリル性基質の種類によって 2 つのサブグループに分類される (4)。植物、真正細菌、古細菌の酵素は、DMAPP、GPP、FPP をアリル性基質に用いることができるのに対して、真菌類やほ乳類の酵素はアリル性基質として FPP のみを利用することができる。GGPP は、ジテルペン、カロテノイド、ゲラニルゲラニル化タンパク質、古細菌のエーテル結合膜脂質等の前駆物質となる。ヘキサプレニルニリン酸 (HexPP、 $C_{30}$ ) 合成酵素、ヘプタプレニルニリン酸 (HepPP、 $C_{35}$ ) 合成酵素、オクタプレニルニリン酸 (OPP、 $C_{40}$ ) 合成酵素、ソラネシルニリン酸 ( $C_{45}$ ) 合成酵素、デカプレニルニリン酸 ( $C_{50}$ ) 合成酵素が生成する  $C_{30}$  から  $C_{50}$  の鎖長のプレニルニリン酸は、キノンの側鎖として利用される。チクルあるいはグッタペルカといった植物樹脂は高分子量の *E* 型プレニル鎖で構成され、特定の *E* 型長鎖プレニルニリン酸合成酵素がその生合成に関与すると考えられている (5, 6)。

FPP 合成酵素 (7-11)、GGPP 合成酵素 (12-16)、HexPP 合成酵素 (17)、HepPP 合成酵素 (18)、OPP 合成酵素 (19)、ソラネシルニリン酸合成酵素 (20)、デカプレニルニリン酸合成酵素 (21) といった *E* 型プレニルニリン酸合成酵素の遺伝子が数多く単離され、それらの一次配列の比較からいくつかの保存配列が見出された。この配列類似性はこれらの酵素が 1 つの祖先型酵素から進化したことを示唆している (22)。変異型酵素の解析から、アスパラギン酸に富む 2 つのモチーフのうち、最初のモチーフ (First Aspartate-Rich Motif, FARM) がアリル性基質結合部位であり、2 番目のモチーフが IPP 結合部位であることがわかった (23)。またヒナドリ由来 FPP 合成酵素の立体構造解析から、各モチーフ内のアスパラギン酸のカルボキシル基が  $Mg^{2+}$  イオンを介して、



基質の二リン酸基と結合することがわかった (24)。しかし、どのようにして現在の *E* 型プレニル二リン酸合成酵素が生成物特異性を獲得し、祖先型酵素から進化したかについては第 3 章で述べたような一部の情報しか得られていなかった (25)。

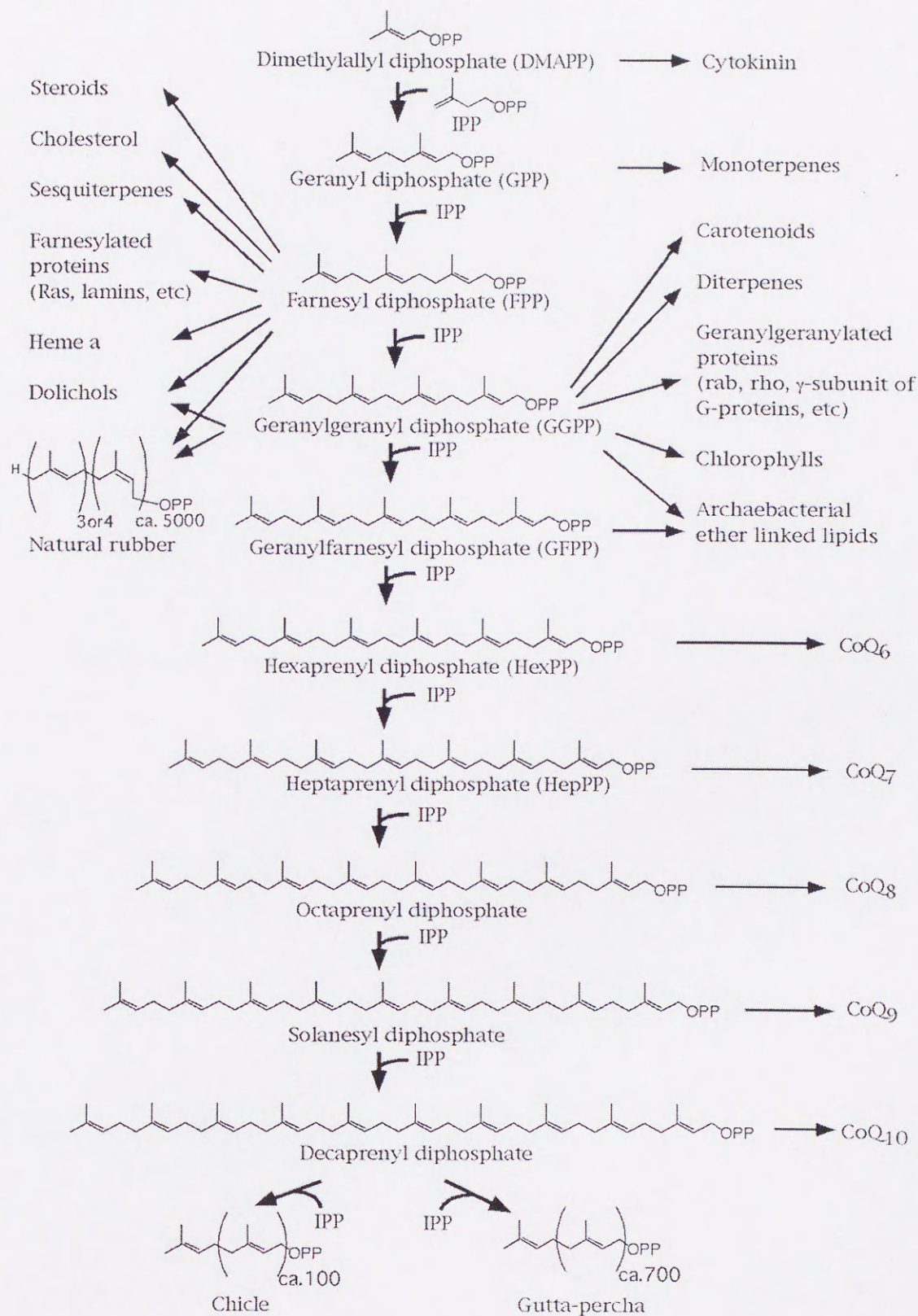


図 4-1 様々な鎖長の *E* 型プレニル二リン酸



第2章で述べたように、*Sulfolobus acidocaldarius* GGPP 合成酵素において 77 位のフェニルアラニンが生成物鎖長決定に重要であることがわかった (26)。また、我々のグループによって、*Bacillus stearothermophilus* FPP 合成酵素では 81 位のチロシンが生成物鎖長決定に重要であることもわかった (27)。これらの芳香族アミノ酸は FARM から 5 残基上流に位置し、非芳香族アミノ酸への置換は生成物特異性の変化を引き起こす。野生型酵素からは  $C_{15}$  あるいは  $C_{20}$  といった決められた長さの生成物しか得られないが、置換をもつ変異型酵素ではその制限を超えて縮合反応が起こり、野生型よりも長鎖の生成物を与える。さらに我々のグループの研究より、変異型 FPP 合成酵素において導入された 81 位のアミノ酸側鎖の大きさと生成物鎖長とが反比例することがわかった (28)。これらの結果から、伸長するプレニル鎖の $\omega$ -末端と FARM 上流 5 番目のアミノ酸残基が直接作用して IPP の縮合反応を妨げることが示された。

それまで、FARM 上流 5 番目のアミノ酸を置換した変異型 FPP 合成酵素あるいは変異型 GGPP 合成酵素を数多く作製したが、生成物鎖長が  $C_{30}$  よりも長い変異型酵素を得ることはできなかった (26-28)。そこで、FARM 上流にある別のアミノ酸がプレニル鎖のさらなる伸長をブロックしており、そのアミノ酸を置換することが FPP 合成酵素あるいは GGPP 合成酵素を  $C_{30}$  より長鎖生成物を与える酵素に変換するのに必須ではなかろうかと予想した。第4章では、この仮説を確かめるために *S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素および *B. stearothermophilus* FPP 合成酵素の FARM 上流領域に変異を導入し、長鎖プレニル二リン酸合成酵素への変換を試みた結果について述べる。ここで作製した変異型酵素の解析結果は、生成物のプレニル鎖が通過する酵素内の空間についての情報を与え、鎖延長反応停止機構の解明につながるはずである。さらに、ここで得られた知見から伸長反応が繰り返される「ポリマー」合成酵素を作製することが可能になるかもしれない。



## 4-2 実験方法

### 試料

逆相 TLC プレート LKC18 は Whatman 社から、HPTLC プレート RP-18 は Merck 社から購入した。(all-*E*)-FPP、(all-*E*)-GGPP、GPP、DMAPP は東北大学反応化学研究所小倉研究室で合成されたものを使用した (15)。プラスミド pEX11 も同研究室より頂いた (10)。 $[1-^{14}\text{C}]$ IPP は Amersham Pharmacia Biotech 社から購入した。他の全ての試薬は市販の特級品を使用した。プラスミド pBS-GGPS および pBS-GGPSmut3 については第 2 章で述べた (26)。

### DNA シークエンス

変異型 GGPP 合成酵素の塩基配列は Perkin Elmer 社のモデル 373 DNA シークエンサーを用いたジデオキシ法によって確認した。

### 変異型 GGPP 合成酵素の作製

Kunkel 法によって *S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素遺伝子に部位特異的変異を導入した (29)。F77S の置換をもつ変異型 GGPP 合成酵素をコードするプラスミド pBS-GGPSmut3 から dU を含む一本鎖 DNA を調製し、それを鋳型として以下の合成オリゴヌクレオチドを使って 4 種類の変異型 GGPP 合成酵素遺伝子を作製した。太字は置換された塩基を、下線は新たに導入された制限酵素部位を表す。

プラスミド	合成オリゴヌクレオチド
pGGPS-L1	oligo-V73A, 5'-GGTGCAGCAATTGAAGCTCTTCATAC-3'
pGGPS-L2	oligo-V73G, 5'-GGTGCAGCAATTGAAGGTCTTCATAC-3'
pGGPS-L3	oligo-L74A, 5'-GGTGCAGCAATTGAAGTTGCTCATAC-3'
pGGPS-L4	oligo-L74G, 5'-GGTGCAGCAATTGAAGTTGGTCATAC-3'

野生型 GGPP 合成酵素遺伝子をコードするプラスミド pBS-GGPS の dU を含む一本鎖 DNA を鋳型に、合成オリゴヌクレオチド oligo-L74G を用いて Kunkel 法によって、プラスミド pGGPS-L5 を作製した。

さらに dU を含む pGGPS-L4 の一本鎖 DNA を鋳型に、以下の合成オリゴヌクレオチドを使い、同様の手法で 4 種類の変異型 GGPP 合成酵素遺伝子を作製した。太字は置換された塩基を、下線は新たに導入された制限酵素部位を表す。

プラスミド	合成オリゴヌクレオチド
pGGPS-L6	oligo-F77A, 5'-CATACTGCTACGCTTGTTCATGATG-3'
pGGPS-L7	oligo-F77G, 5'-CATACTGGTACGCTTGTTCATGATG-3'
pGGPG-L8	oligo-I71G-1, 5'-GGTGCAGCTGGTGAAGTTGGTCATACTTCTACG-3'
pGGPS-L9	oligo-E72G-1, 5'-GGTGCAGCAATTGGAGTTGGCCATACTTCTACG-3'



同様の手法で、dU を含む pGGPS-L7 の一本鎖 DNA を鋳型に、以下の合成オリゴヌクレオチドを使って 2 種類の変異型 GGPP 合成酵素遺伝子を作製した。太字は置換された塩基を、下線は新たに導入された制限酵素部位を表す。

プラスミド 合成オリゴヌクレオチド

pGGPG-L10 oligo-I71G-2, 5'-GGTGCAGCTGGTGAAGTTGGTCATACTGGTACG-3'

pGGPS-L11 oligo-E72G-2, 5'-GGTGCAGCAATTGGAGTTGGCCATACTGGTACG-3'

### 変異型 GGPP 合成酵素の調製

第 2 章で述べた方法に従って、作製したプラスミドで形質転換した大腸菌 XL1-Blue 株から熱処理した粗酵素抽出液を調製した (26, 30)。

### プレニルニリン酸合成酵素活性の測定と生成物分析

第 2 章で述べた方法に従って、プレニルニリン酸合成酵素活性を測定して生成物分析を行った (26, 31)。長鎖生成物の鎖長決定のために、10 ml の反応溶液から同様の手法で生成物を抽出し、逆相 HPTLC 分析を行った。プレートには RP-18 を、展開溶媒にはアセトン/ヘキサン(19:1)を使用した。

### 変異型 FPP 合成酵素の作製

*B. stearothermophilus* FPP 合成酵素をコードするプラスミド pEX11 を鋳型にして、以下の 4 種類のプライマーを用いて PCR 法によって変異型 FPP 合成酵素、FPS-F1 をコードするプラスミド pFPS-F1 を作製した。太字は置換された塩基を、下線は新たに導入された制限酵素部位を表す。

プライマー 1, 5'-ATCATCATGAATCAAAGAGCCCGTATGGCCCATTTTC-3'

プライマー 2, 5'-AAACAGACCATGGCGCTTTTC-3'

プライマー 3, 5'-CAGCCAAGCTTTTAATGGTC-3'

プライマー 4, 5'-CTTTGATTCATGATGATTTG-3'

プライマー 1 と 2 の組み合わせで酵素遺伝子上流断片を、またプライマー 3 と 4 の組み合わせで酵素遺伝子下流断片を増幅し、各 PCR 産物をそれぞれ *Nco*I-*Bsp*HI、あるいは *Bsp*HI-*Hind*III で消化後、ともに pEX11 から作製した *Nco*I-*Hind*III ベクターに組み込み、pFPS-F1 を作製した。

次いで pFPS-F1 を鋳型にして、以下の 2 種類のプライマーを用いて PCR を行い、増幅断片を平滑化後、自己環化させ、変異 FPP 合成酵素、FPS-F2 をコードするプラスミド pFPS-F2 を作製した。

プライマー 5, 5'-ATGGACAACGATGATTTGCG-3'

プライマー 6, 5'-CAAATCATCATGGATCAAAG-3'



### 変異型 FPP 合成酵素の調製

作製したプラスミドで形質転換した大腸菌 XL1-Blue 株から、第 2 章で述べた方法に従って熱処理した粗酵素抽出液を調製した (26, 30)。ただし、熱処理時間は 1 時間とし、sonication buffer は以下の組成のものを使用した (10, 27, 28)。

sonication buffer for *B. stearrowthermophilus* FPP synthase

25 mM	Tris-HCl, pH 8.5
10 mM	$\beta$ -mercaptoethanol
1 mM	EDTA

### プレニルニリン酸合成酵素活性の測定と生成物分析

調製した変異型 FPP 合成酵素について、第 2 章で述べた方法に従ってプレニルニリン酸合成酵素活性を測定し、生成物分析を行った (26, 31)。ただし、assay mixture は以下の組成のものを使用し、生成物の抽出を 1 ml 水飽和ブタノールで行い、抽出液 200  $\mu$ l (1/5 量) を放射能測定に用い、残りの生成物を逆相 TLC で分析した (10, 27, 28)。

assay mixture for *B. stearrowthermophilus* FPP synthase

(total volume 200  $\mu$ l)

MgCl <sub>2</sub>	1 $\mu$ mol
Tris-HCl, pH 8.5	10 $\mu$ mol
NH <sub>4</sub> Cl	10 $\mu$ mol
$\beta$ -mercaptoethanol	10 $\mu$ mol
allylic substrate	25 nmol
[1- <sup>14</sup> C]IPP(1 Ci/mol)	25 nmol
crude enzyme	a suitable amount



#### 4-3 結果

##### プレニル鎖の伸長を妨げるアミノ酸の探索

第2章で述べたように、FARM 上流 5 番目に位置する 77 位のフェニルアラニンをセリンあるいはロイシンに置換した変異型 *S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素は、ゲラニルファルネシルニリン酸 (GFPP、 $C_{25}$ ) を主生成物として、ヘキサプレニルニリン酸 (HexPP、 $C_{30}$ ) まで生成した。しかし、これらの変異型酵素からは  $C_{30}$  よりも長鎖の生成物を得ることはできなかった (26)。我々のグループによる *B. stearrowthermophilus* FPP 合成酵素の生成物鎖長制御に関する研究から、この FPP 合成酵素において、GGPP 合成酵素の 77 位に対応する 81 位のチロシンの置換が生成物鎖長を変化させ、プレニル鎖の $\omega$ -末端が 81 位のアミノ酸と直接接触することもわかった。しかし、FARM 上流 5 番目の置換によって  $C_{30}$  より長鎖を生成する変異型 FPP 合成酵素を作製することはやはりできなかった (27, 28)。これらの変異型酵素の解析結果から、77 位のみを置換した変異型 *S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素から  $C_{30}$  よりも長鎖の生成物が得られないのは、77 位から 1 イソプレン単位に相当する距離にあるアミノ酸がそれ以上の伸長を妨げるためであろうと考え、そのアミノ酸の探索を以下の情報に基づいて試みた。

1994 年に Tarshis らによって三次元立体構造が決定されたヒナドリ由来 FPP 合成酵素 (24) は、*S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素と *B. stearrowthermophilus* FPP 合成酵素に対してある程度のアミノ酸配列の相同性を示す。したがって、*S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素と *B. stearrowthermophilus* FPP 合成酵素は類似の立体構造をとると考えられる。ヒナドリ由来 FPP 合成酵素の立体構造では、FARM 周辺の領域は $\alpha$ -ヘリックスを形成する。 $\alpha$ -ヘリックス 1 周あたり平均 3.6 個のアミノ酸残基が存在し、その間隔は 5.4 Å である。これは炭素結合の間隔から算出した 1 イソプレン単位の長さ (約 5.1 Å) とほぼ同等である。そこで、プレニル鎖が $\alpha$ -ヘリックスに沿って伸長しており 77 位を置換した変異型 GGPP 合成酵素では 77 位から $\alpha$ -ヘリックス 1 周離れたアミノ酸側鎖によって伸長が妨げられると仮定すると、その側鎖をも除いた変異型酵素は  $C_{30}$  よりも長鎖の生成物を与えると予想した。

この仮説を確かめるために、2 つの置換をもつ変異型 *S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素を数種類作製した。第 1 の変異は FARM 上流の 5 番目の 77 位に、第 2 の変異はその位置から 3 番目あるいは 4 番目上流に導入した (図 4-2)。



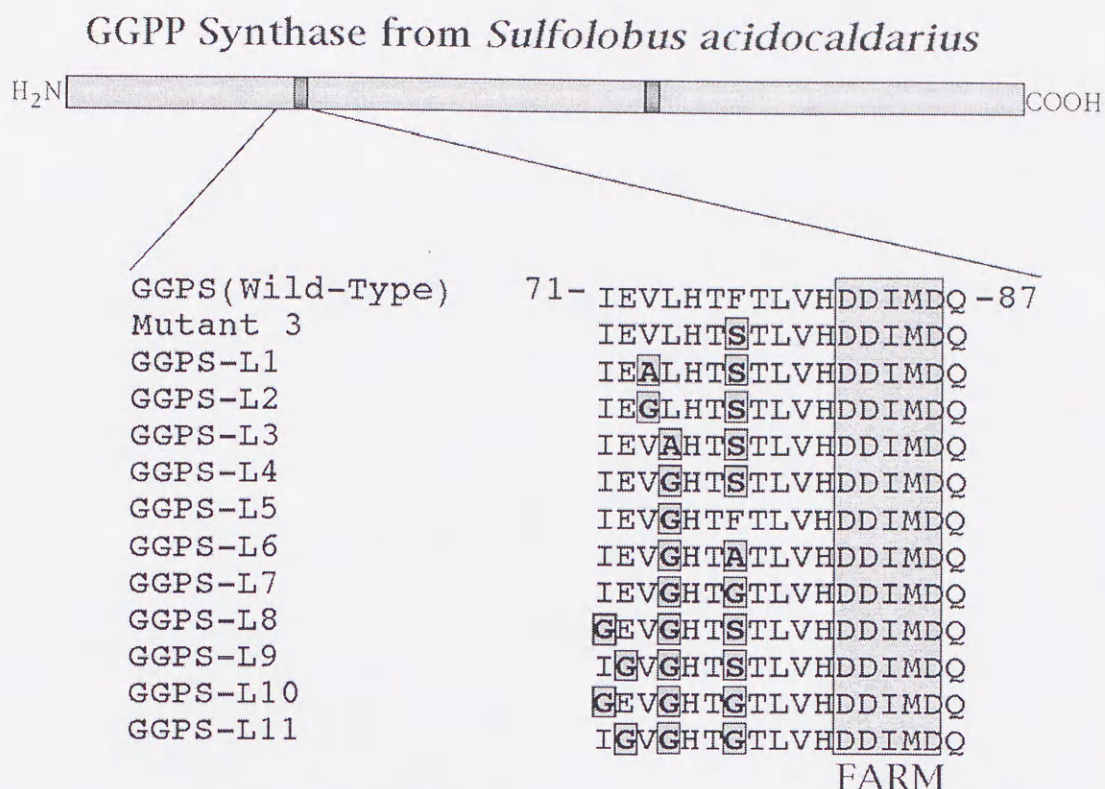


図 4-2 野生型および変異型 GGPP 合成酵素のアミノ酸配列

## 2 つの置換をもつ変異型 GGPP 合成酵素の活性測定

2 つの置換をもつ変異型 GGPP 合成酵素をコードするプラスミドで形質転換した大腸菌 XL1-Blue 株から熱処理した粗酵素抽出液を調製した。野生型 GGPP 合成酵素は極めて熱に安定であるが (15)、変異型酵素についても 70°C で 7 時間の熱処理後も活性の低下はみられず、同様の熱安定性を示した (表 4-1)。また熱処理の前後で生成物分布は変化しなかった (data not shown)。

各変異体酵素の比活性は DMAPP、GPP、FPP、GGPP をアリル性基質に用いて酵素反応を行い、ブタノール抽出液の放射エネルギーを測定して決定した (表 4-1)。GPP を用いて反応を行った場合、GGPS-L4 と GGPS-L7 以外の変異型酵素は、野生型酵素と同程度の活性を示した。また、GPP を用いたときの活性を基準に他のアリル性基質を用いたときの相対活性を算出したところ、DMAPP、FPP を用いたときの相対活性について、すべての変異型酵素と野生型酵素はほぼ同じ傾向を示した。これに対して、GGPP を用いたときの相対活性は 1.68% から 44.4% まで大きく異なっていた。野生型酵素ではアリル性基質に GGPP を用いたときの活性はほとんど検出されなかった。また、GGPS-L5 の GGPP に対する活性も低く、74 位の置換のみでは基質特異性が大きく変わらないことが示唆された。GGPS-L1、GGPS-L2、GGPS-L3 の GGPP に対する相対活性は Mutant 3 と変わらないのに対して、GGPS-L4、GGPS-L6、GGPS-L7 の GGPP に対する活性はそれらの変異型酵素よりも高かった。これらの結果から、73 位の置換が生成物鎖長に影響せず、L74G の置換が Mutant 3 よりも長鎖の生成物を与えるのに作用することが推測された。このことを確かめるために生成物分析を行った。



表 4-1 野生型および変異型 GGPP 合成酵素の活性

Enzyme	Specific activity	Relative activity				Thermostability
		DMAPP	GPP	FPP	GGPP	
	nmol/min/mg protein	%				
wild type (C <sub>20</sub> )	6.4±0.41	100±1.7	100±6.7	48±9.2	1.7±0.73	95±5.2
Mutant 3 (C <sub>25</sub> , F77S)	7.3±0.35	96±1.0	100±4.8	59±1.9	11±2.7	120±3.4
GGPS-L1 (C <sub>25</sub> , V73A & F77S)	9.1±0.58	83±7.1	100±6.8	72±1.7	11±3.5	110±11
GGPS-L2 (C <sub>25</sub> , V73G & F77S)	8.1±0.34	89±8.5	100±4.2	68±3.3	14±3.6	110±7.3
GGPS-L3 (C <sub>25</sub> , L74A & F77S)	7.1±0.16	90±2.4	100±2.3	64±1.9	10±1.3	120±11
GGPS-L4 (C <sub>30</sub> , L74G & F77S)	4.0±0.13	130±4.0	100±3.3	41±3.5	22±0.78	140±5.8
GGPS-L5 (C <sub>20</sub> , L74G)	9.0±0.58	86±7.8	100±7.0	42±3.3	3.4±0.37	95±12
GGPS-L6 (C <sub>30</sub> , L74G & F77A)	6.1±0.51	100±6.9	100±8.7	39±5.1	18±2.7	110±5.0
GGPS-L7 (C <sub>35</sub> , L74G & F77G)	1.2±0.022	300±19	100±2.1	60±4.1	44±6.3	100±4.1

括弧内に長鎖主生成物と変異を示す。熱安定性は 70°C で 7 時間の熱処理後の残存活性を表す。

## 2 つの置換をもつ変異型 GGPP 合成酵素の生成物分析

反応生成物のリン酸基を酸性ホスファターゼで加水分解後、得られたプレノールについて TLC 分析を行い、生成物分布を調べた (図 4-3)。長時間の酵素反応で一度放出された中間生成物が再度酵素に結合してアリル性基質に用いられる可能性があるため、中間生成物の酵素への再結合を起こさず反応の初期に放出される生成物鎖長を調べるために、酵素反応を基質の約 10%が消費された時点で停止した。25 μM [1-<sup>14</sup>C]IPP と 25 μM DMAPP を用いて酵素反応を行ったとき、野生型 GGPP 合成酵素は GGPP を主生成物として与え、それよりも長鎖の生成物は得られなかった。第 2 章で示した結果と同様に、F77S の置換をもつ Mutant 3 は GFPP を主生成物として、他に少量の FPP、GGPP、HexPP も生成した (26)。GGPS-L1 と GGPS-L2 の結果が示すように、F77S に加えて 73 位を置換しても生成物分布は変化しなかった。これに対して、GGPS-L3 は主生成物は C<sub>25</sub> であるが、HepPP (C<sub>35</sub>) をわずかに生成した。GGPS-L4 は HexPP (C<sub>30</sub>) を長鎖主生成物 (>C<sub>20</sub>) として与え、HepPP もある程度生成した。加えて、GGPS-L4 からは HepPP より長鎖の生成物もわずかに得られた (図 4-3A)。これらの結果から、F77S に加えて 74 位を置換することにより生成物鎖長が長くなり、且つ 74 位のアミノ酸側鎖が小さい方がより長鎖生成物を与える傾向があることがわかった (Leu-74 < Ala-74 < Gly-74)。

我々のグループの以前の研究から、*B. stearothermophilus* FPP 合成酵素において FARM 上流 5 番目のアミノ酸の置換が生成物鎖長を大きく変化させ、平均生成物鎖長がその位置のアミノ酸側鎖の表面積とほぼ反比例することがわかった (28)。また *S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素において同様の結果が得られており、F77S あるいは F77G という置換をもつ変異型 GGPP 合成酵素の主生成物はそれぞれ C<sub>25</sub> あるいは C<sub>30</sub>



となることがわかった (data not shown)。これらの結果から、L74G の置換に加え 77 位をセリンよりも側鎖の小さいアラニンあるいはグリシンに置換すれば、変異型酵素はさらに効率的に長鎖生成物を与えると予想し、GGPS-L6 (L74G&F77A)、GGPS-L7 (L74G&F77G) という変異型酵素を作製し、解析を行った。DMAPP をアリル性基質として用いた場合、GGPS-L6 の HexPP 生成割合は GGPS-L4 に比べて約 2 倍となり、GGPS-L7 の長鎖主生成物 ( $>C_{20}$ ) が HepPP となった (図 4-3A)。これらの結果から、2 つの置換をもつ酵素においても FARM 上流 5 番目のアミノ酸側鎖の大きさが生成物鎖長に影響することが示された。

L74G の 1 つの置換をもつ GGPS-L5 の GGPP に対する相対活性は低かったが、GFPP を多く生成した (表 4-1、図 4-3)。同様の生成物分布が GPP、FPP、GGPP をアリル性基質に用いた場合に観察された (図 4-3B、C、D)。

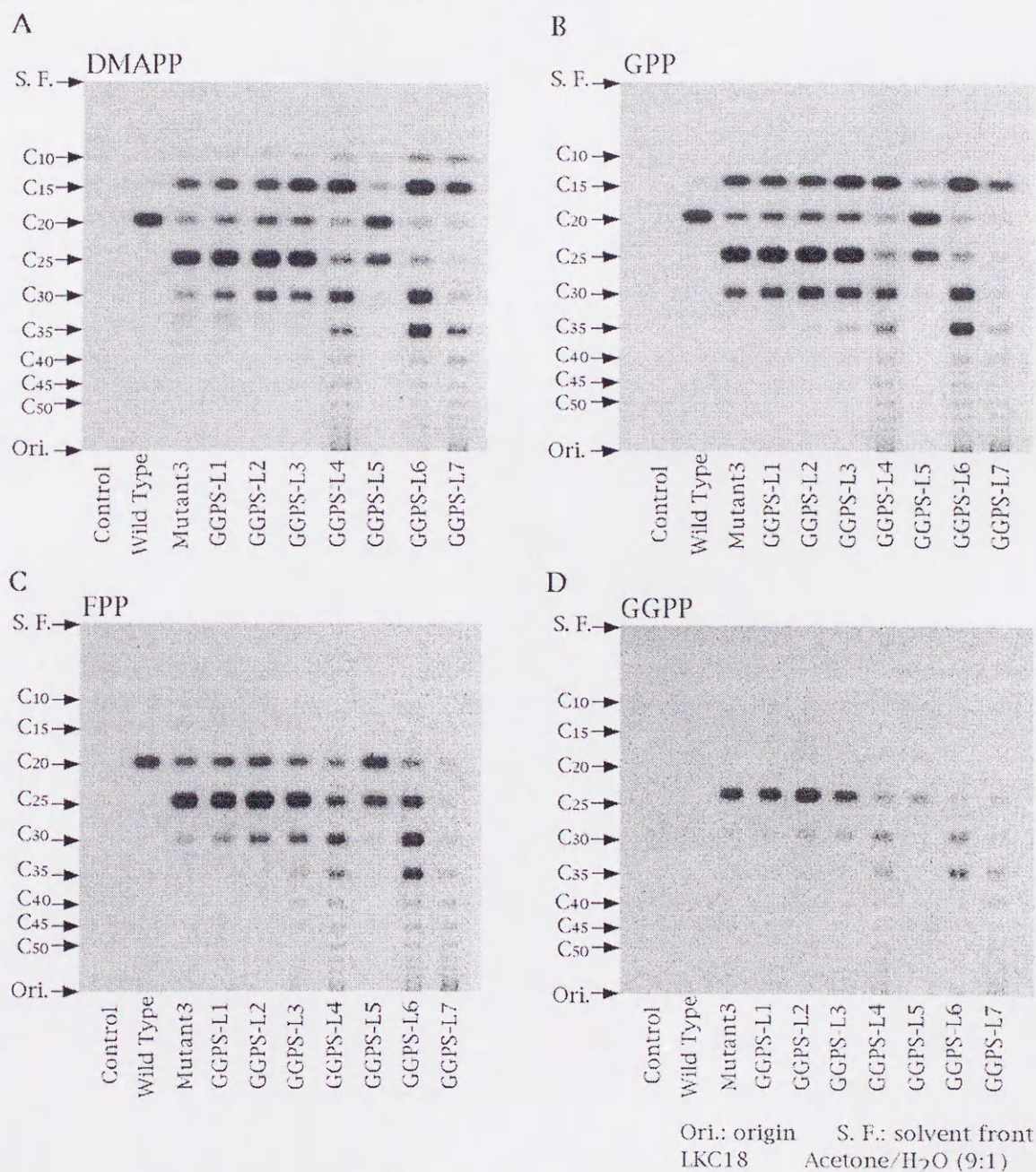


図 4-3 2 つの置換をもつ変異型 GGPP 合成酵素の生成物分析



### 3つの置換をもつ変異型 GGPP 合成酵素の作製と生成物分析

この章で述べたように、2つの置換をもつ変異型酵素は1つの置換をもつ酵素よりも長鎖の生成物を与え、 $C_{35}$ よりも長鎖の生成物もわずかに得られた。しかし、 $C_{35}$ よりも長鎖のプレニル二リン酸が主生成物となることはなかった。これらの結果から、74位よりも上流のアミノ酸側鎖がプレニル鎖の伸長を妨げており、それを除くことにより伸長反応が停止せずチクルやグッタペルカのようなポリマーの生成が可能になると考えられた。そこで、74位と77位の置換に加え71位または72位も置換した変異型酵素を4種類作製し(図4-2)、生成物分析を行った(図4-4)。第3の変異は、第2の変異導入位置の74位から $\alpha$ -ヘリックス1周離れたところに導入した。 $25\text{ }\mu\text{M}$   $[1\text{-}^{14}\text{C}]\text{IPP}$  と  $25\text{ }\mu\text{M}$   $\text{DMAPP}$  を用いて酵素反応を行ったとき、3つの置換をもつ GGPS-L10 (I71G&L74G&F77G) は、HepPP に比べて OPP を多く生成して OPP が長鎖主生成物 ( $>C_{20}$ ) となった (OPP/HepPP = 2.3)。GGPS-L7 (L74G&F77G) では HepPP が長鎖主生成物 (OPP/HepPP = 0.34) であったので、I71G の置換を加えることにより長鎖主生成物が1イソプレン単位伸びたことになる。また、別の3つの置換をもつ酵素である GGPS-L8 (I71G&L74G&F77S) は、HexPP に比べて HepPP を多く生成して HepPP が長鎖主生成物となった (HepPP/HexPP = 2.6)。GGPS-L4 (L74G&F77S) では HexPP が長鎖主生成物 (HepPP/HexPP = 0.29) であるので、この場合も I71G の置換が長鎖主生成物の鎖長を1イソプレン単位伸ばす結果となった。一方、GGPS-L9 と GGPS-L11 の生成物分布は、対応する GGPS-L4 と GGPS-L7 と比較して  $C_{25}$  よりも長鎖の生成物の割合がわずかに増加したが、大きな違いはみられなかった(図4-3、図4-4)。これらの結果から、71位のアミノ酸側鎖が伸長するプレニル鎖の $\omega$ -末端と直接作用することが示された。同様の生成分布が GPP、FPP、GGPP をアリル性基質に用いた場合に観察された(図4-4B、C、D)。

### $C_{35}$ よりも長鎖の生成物分析

図4-3と図4-4に示すように、8種類の変異型酵素、GGPS-L3、GGPS-L4、GGPS-L6、GGPS-L7、GGPS-L8、GGPS-L9、GGPS-L10、GGPS-L11 は極めて長鎖のプレニル二リン酸を生成し、いくつかの変異型酵素の生成物のラダーは TLC プレートのオリジンにまで達した。そこで、生成物の最大の鎖長を知るために、10 ml (図4-3と図4-4での条件の10倍)の酵素反応溶液から得られた生成物を用いて長鎖プレノールの分離に適した条件で TLC 分析を行った(図4-5)。その結果、これら8種類の変異型 GGPP 合成酵素が  $C_{35}$  よりも長鎖の生成物を与えることがわかった。しかし、最大の生成物鎖長は変異型酵素ごとに異なっており、GGPS-L3、GGPS-L4、GGPS-L6、GGPS-L7、GGPS-L8、GGPS-L9、GGPS-L10、GGPS-L11からは、それぞれ  $C_{65}$ 、 $C_{120}$ 、 $C_{105}$ 、 $C_{110}$ 、 $C_{90}$ 、 $C_{80}$ 、 $C_{80}$ 、 $C_{70}$  の鎖長の生成物まで検出された。このように生成物鎖長に違いが生じたのは、それぞれの変異型酵素で異なっている FARM 上流領域の構造が長鎖生成物の形成に影響したためであると考えられる。また生成物鎖長から考えると、いくつかの変異型酵素についてはプレニル鎖が通過する空間が酵素の外表に達したと推測される。



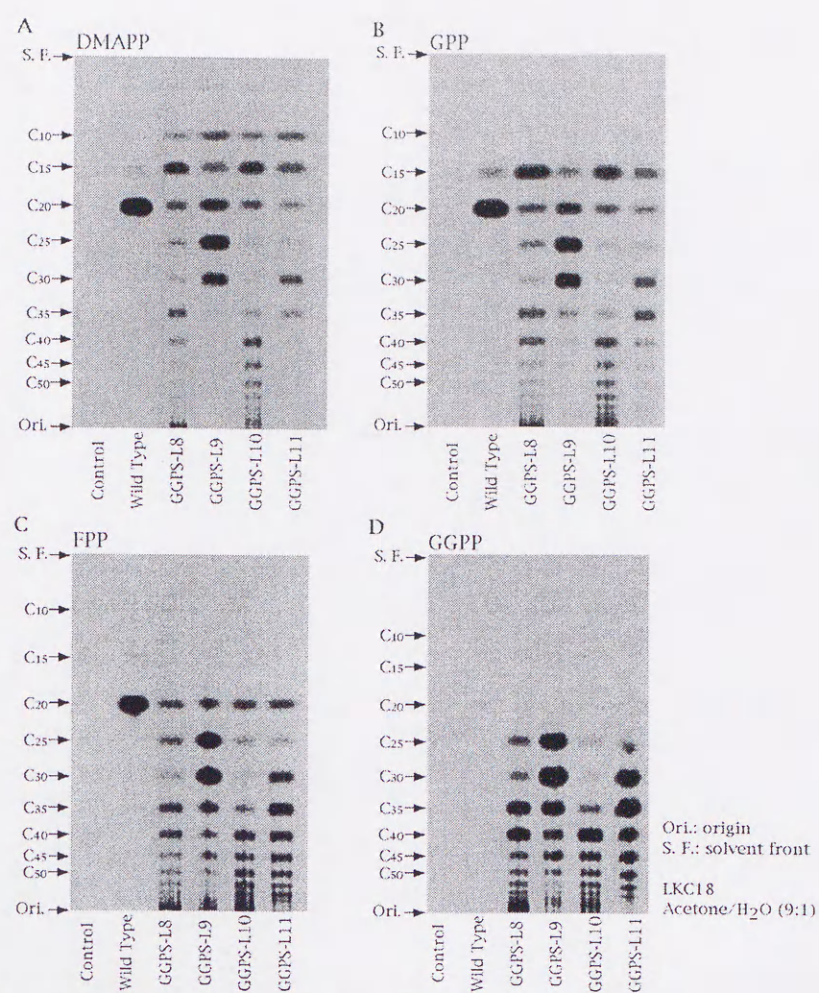


図 4-4 3つの置換をもつ変異型 GGPP 合成酵素の生成物分析

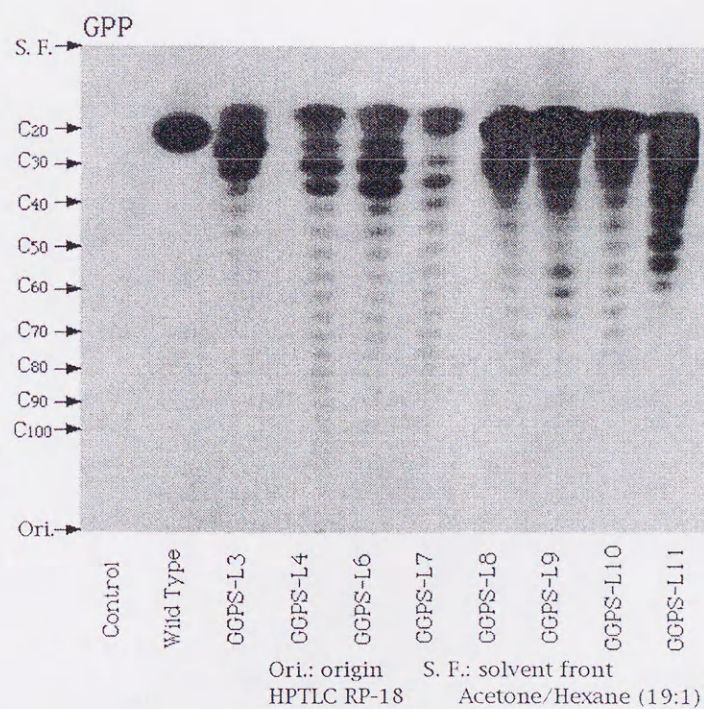


図 4-5 長鎖生成物の分析



### 変異型 FPP 合成酵素の生成物分析

この章で述べたように、2つあるいは3つの置換をもつ変異型 *S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素は、1つの置換をもつ酵素に比べて著しく鎖長の長い生成物を与えることがわかった。同様の手法で他の短鎖プレニルニリン酸合成酵素を長鎖プレニルニリン酸合成酵素へ変換できるのであろうか。この可能性を調べるために *B. stearothermophilus* FPP 合成酵素に PCR で変異を導入して2種類の変異酵素 (FPS-F1、FPS-F2) を作製し (図 4-6)、生成物を分析した (図 4-7)。FPS-F1 は I78G と Y81G の2つの置換をもち、GGPS-L7 に対応する。FPS-F2 は I78G と Y81G の2つの置換に加え、FARM 中の2つのアミノ酸が除かれている。第3章で述べた結果から、*B. stearothermophilus* 等の原核生物由来 FPP 合成酵素の FARM には2つのアミノ酸の挿入が存在してわずかに生成物鎖長が短くなるように作用するので、それを除くことで効率的に長鎖生成物が得られることを期待した (25)。生成物分析の結果、これらの変異型 FPP 合成酵素は、野生型酵素や Y81G の1つの置換をもつ酵素よりも生成物鎖長が長くなることがわかった (図 4-7)。FPS-F1 は GFPP、HexPP、HepPP を主生成物として与え、C<sub>40</sub>-C<sub>65</sub> の鎖長のプレニルニリン酸も生成した。DMAPP をアリル性基質に用いたときの生成物分布は、GPP (2.40%)、FPP (10.5%)、GGPP (3.74%)、GFPP (15.1%)、HexPP (43.9%)、HepPP (15.9%)、OPP (4.25%)、C<sub>45</sub>PP (1.91%)、C<sub>50</sub>PP (0.68%)、C<sub>50</sub> よりも長鎖の生成物 (1.65%) となった。FPS-F1 と FPS-F2 の生成物分布はともに GGPS-L7 とほぼ同じであった。これらの結果から、*S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素と *B. stearothermophilus* FPP 合成酵素の FARM 上流領域の構造が類似しており、共通の機構が生成物鎖長を制御することが確かめられた。また FPS-F1 と FPS-F2 の生成物分布にあまり違いがなかったことから、FPS-F2 における2つのアミノ酸の除去は FARM 上流領域の立体構造を大きく変えなかったと考えられる。反応条件を検討した結果、これらの変異型 FPP 合成酵素は、C<sub>30</sub> を長鎖の主生成物として与え、C<sub>65</sub> まで生成することが確認された。

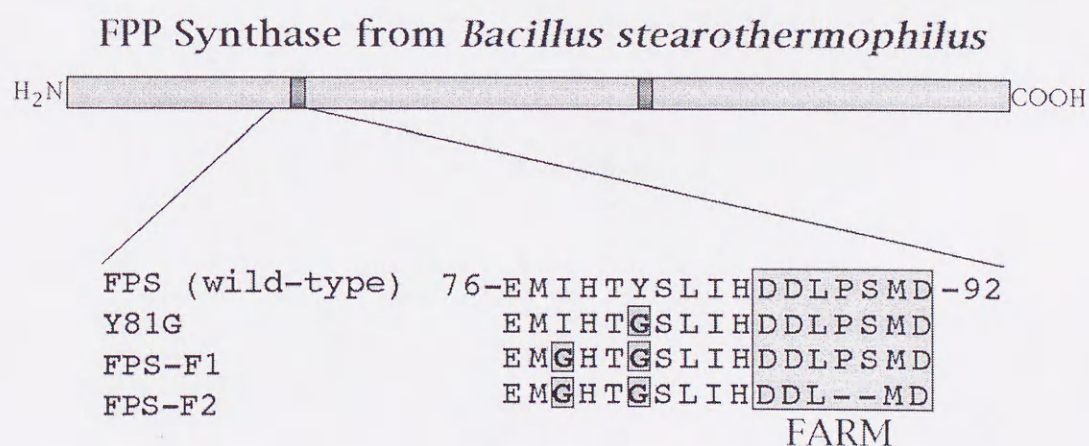


図 4-6 野生型および変異型 FPP 合成酵素のアミノ酸配列



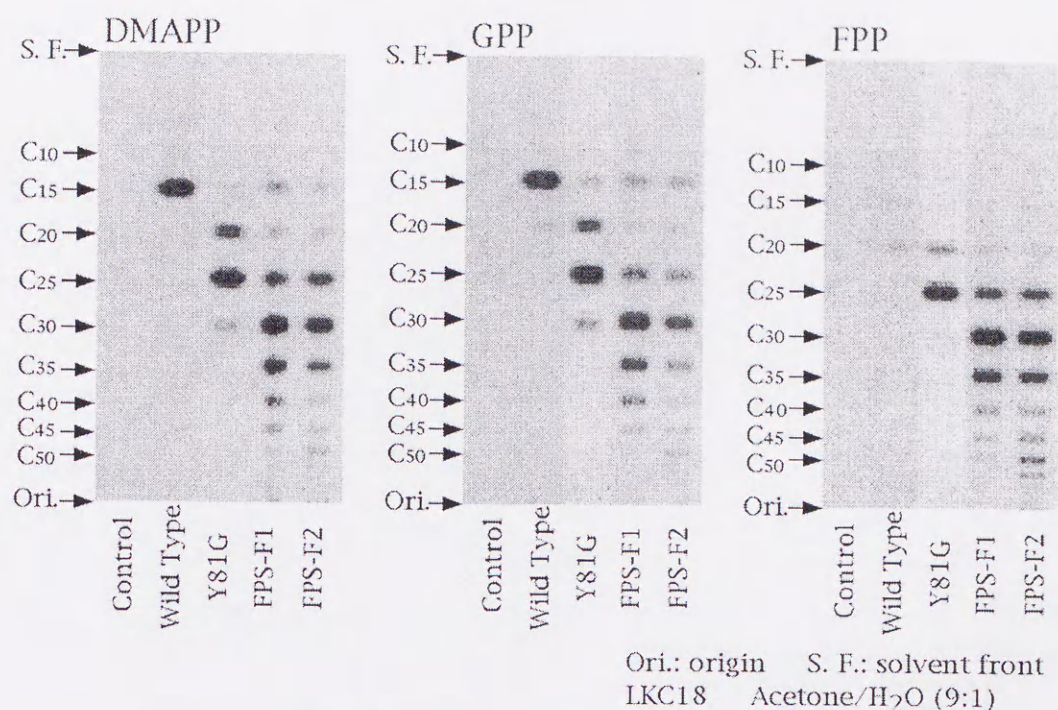


図 4-7 変異型 FPP 合成酵素の生成物分析

#### 反応条件の検討

この章で述べたように、FARM 上流への 2、3 のアミノ酸置換によって GGPP 合成酵素や FPP 合成酵素といった短鎖プレニル二リン酸合成酵素を C<sub>30</sub> 以上を生成する長鎖プレニル二リン酸合成酵素に変換することができた。しかし、これらの変異型酵素のほとんどが短鎖中間生成物を相当量生成した。ウンデカプレニル二リン酸合成酵素、ソラネシル二リン酸合成酵素、天然ゴム合成酵素といった長鎖プレニル二リン酸合成酵素では、界面活性剤、キャリアータンパク質、ラテックス粒子等の補因子が活性発現に必要であり、これらの補因子は酵素から長鎖生成物を効率的に除く働きをする (32-37)。そこで、界面活性剤が生成物鎖長に与える効果について検討を行った。2.5% Triton X-100 を添加して酵素反応を行ったとき、野生型酵素と変異型酵素の活性は数倍に上昇した。このことから、Triton X-100 が酵素から生成物を効率的に解離させ、ターンオーバーを高めることが示された。しかし、Triton X-100 の添加によっても生成物分布は変化せず、Tween 80 や CHAPS といった他の界面活性剤も生成物鎖長に影響を与えなかった (data not shown)。

我々のグループによって、いくつかのプレニル二リン酸合成酵素の生成物分布が基質や Mg<sup>2+</sup> イオンの濃度に依存して変化することが以前に報告されている。例えば、IPP あるいは Mg<sup>2+</sup> イオンの濃度が低い場合にソラネシル二リン酸合成酵素の中間生成物量がわずかに増加し、その多くは FPP や GGPP であり、C<sub>35</sub> や C<sub>40</sub> もある程度生成することがわかった (38)。この条件でのソラネシル二リン酸合成酵素の生成物分布はこの章で作製した変異型 GGPP 合成酵素と類似していた。また、アリル性基質濃度が低下または IPP 濃度が増加すると、プレニル二リン酸合成酵素の長鎖生成物の割合が増加する傾向も観察された (25, 38)。そこで、界面活性剤を添加してアリル性基質濃度を低



くした条件で、変異型 GGPP 合成酵素の長鎖生成物の割合が増加するかを調べた。25  $\mu$ M GPP と 25  $\mu$ M IPP を用いたときの各変異型 GGPP 合成酵素の主生成物は、GGPS-L9 の場合は GFPP で、それ以外は FPP であった。これに対して、2.5% Triton X-100 存在下で 2.5  $\mu$ M GPP と 25  $\mu$ M IPP を用いて酵素反応を行ったとき、変異型酵素の最終生成物の鎖長は変化しなかったが、主生成物の鎖長が C<sub>25</sub>-C<sub>40</sub> に変化した。この条件での GGPS-L3、GGPS-L4、GGPS-L6、GGPS-L7、GGPS-L8、GGPS-L9、GGPS-L10、GGPS-L11 の主生成物は、それぞれ GFPP (73%)、HexPP (41%)、HexPP (65%)、HepPP (29%)、HepPP (28%)、HexPP (59%)、OPP (31%)、HexPP (34%) となった (図 4-8)。これらの結果から、生成物分布が基質濃度に影響するが、基質濃度や界面活性剤は最終生成物鎖長の決定には重要でないことがわかった。このように変異型 GGPP 合成酵素の特性は、ソラネシルニリン酸合成酵素等の天然の *E* 型長鎖プレニルニリン酸合成酵素とよく類似していることが示された (38)。

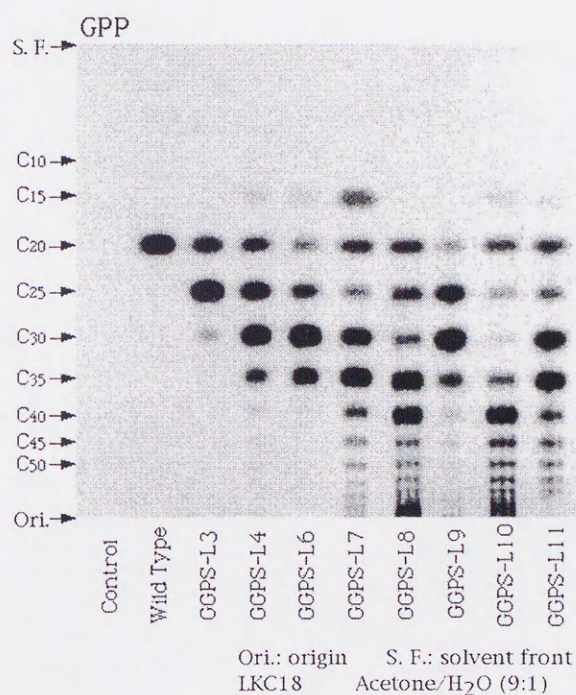


図 4-8 アリル性基質濃度が生成物分布に与える影響  
25  $\mu$ M [1-<sup>14</sup>C]IPP と 2.5  $\mu$ M GPP を 2.5% Triton X-100 存在下で反応させた。



#### 4-4 考察

この章での結果とヒナドリ由来 FPP 合成酵素の三次元立体構造から、*E* 型プレニルニリン酸合成酵素における共通の鎖長決定機構モデルを考えることができた (図 4-9)。野生型の FPP 合成酵素や GGPP 合成酵素では、FARM 上流 5 番目の芳香族アミノ酸が FPP あるいは GGPP が形成された段階でプレニル鎖の伸長を直接ブロックする (図 4-9A)。FPP 合成酵素と GGPP 合成酵素の生成物特異性の違いは、第 3 章で述べたように主に FARM 上流 4 番目のアミノ酸と FARM への 2 つのアミノ酸の挿入によって与えられる (25)。

FARM 上流 5 番目を小さな残基に置換した変異型 FPP 合成酵素や変異型 GGPP 合成酵素では、FPP や GGPP の形成後もプレニル鎖の伸長が妨げられず、野生型酵素よりも生成物鎖長が長くなる (図 4-9B)。GGPP よりも長鎖の生成物を与える天然の *E* 型中鎖および *E* 型長鎖プレニルニリン酸合成酵素では、FARM 上流 5 番目のアミノ酸は例外なくアラニンである (17-21)。この位置のアミノ酸が小さな残基であることがプレニル鎖を通過させて生成物鎖長を GGPP よりも長くするのに必要であるといえる。

FPP 合成酵素あるいは GGPP 合成酵素の FARM 上流 5 番目と 8 番目を小さな残基に置換した場合、これらの 2 つの置換をもつ変異型酵素の長鎖主生成物の鎖長は、FARM 上流 5 番目だけを置換した酵素のものよりも 1 イソプレン単位長くなる (図 4-9C)。2 つの置換をもつ変異型 GGPP 合成酵素、GGPS-L3 (L74A&F77S)、GGPS-L4 (L74G&F77S)、GGPS-L6 (L74G&F77A)、GGPS-L7 (L74G&F77G) の長鎖主生成物は、それぞれ  $C_{30}$ 、 $C_{30}$ 、 $C_{30}$ 、 $C_{35}$  となった。これらの結果から、FARM 上流 5 番目から  $\alpha$ -ヘリックス 1 周離れた 74 位のロイシンがプレニル鎖の伸長を妨げるアミノ酸であり、FARM 上流 5 番目のアミノ酸側鎖が生成物鎖長に影響することが示された。また、これらの 2 つの置換をもつ変異型酵素からは  $C_{50}$ - $C_{110}$  の長鎖生成物もわずかに得られることがわかった。ヒナドリ由来 FPP 合成酵素では、94 位から 119 位までのアミノ酸が  $\alpha$ -ヘリックスを形成しており、その末端から FARM の最初のアスパラギン酸までの区間は約 7 周の  $\alpha$ -ヘリックスを含むが、この間隔はソラネシルニリン酸 ( $C_{45}$ ) の炭化水素鎖の長さに相当する。したがって、 $C_{45}$  よりも長いプレニル鎖の  $\omega$  末端は酵素の外へ押し出されると考えられる。

3 つの置換をもつ変異型 GGPP 合成酵素、GGPS-L8 (I71G&L74G&F77S) と GGPS-L10 (I71G&L74G&F77G) は、それぞれ  $C_{35}$  と  $C_{40}$  を長鎖主生成物として与えた。これらの結果から、71 位のイソロイシンがプレニル鎖の伸長を妨げることがわかった (図 4-9D)。また、これら 2 種類の変異型酵素で長鎖主生成物の鎖長が異なるので、FARM 上流 5 番目のアミノ酸側鎖が生成物鎖長に影響するといえる。

この章で述べた結果から、GGPP 合成酵素の中の 3 つのアミノ酸がプレニル鎖の伸長を妨げており、これらのアミノ酸の置換が生成物鎖長の著しい変化をもたらすことが示された。変異型酵素のいくつかは  $C_{100}$  以上の生成物も与えたが、 $C_{100}$  以上の鎖長の生成物が主生成物とはならなかった。酵素内のプレニル鎖が通過する空間周辺のアミノ酸を置換してその通路を改善すれば、鎖延長反応を繰り返して長鎖生成物を効率的に与える「ポリマー」合成酵素をつくり出せるかもしれない。



この章の結果から、HexPP ( $C_{30}$ ) 合成酵素 (39)、HepPP ( $C_{35}$ ) 合成酵素 (40)、OPP ( $C_{40}$ ) 合成酵素 (41)、ソラネシルニリン酸 ( $C_{45}$ ) 合成酵素 (38, 42)、デカプレニルニリン酸 ( $C_{50}$ ) 合成酵素 (43) といった *E* 型中鎖および *E* 型長鎖プレニルニリン酸合成酵素においても、ここで改変した領域に対応する領域の構造が生成物特異性を与えると思われ。しかし一方、生成物特異性は類似するが、天然の *E* 型中鎖および *E* 型長鎖合成酵素と作製した変異型酵素には、利用可能なアリル性基質に関する違いがみられる。天然の酵素が短鎖のアリル性基質である DMAPP を利用できないのに対して、変異型酵素は FPP を用いた場合とほぼ同じ比活性で DMAPP を利用することができる。アリル性基質結合領域の構造が異なることがアリル性基質特異性の違いを与えるのかもしれない (44)。我々のグループの以前の研究で、推定アリル性基質結合領域に変異導入した *S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素は生成物特異性を変えずにアリル性基質特異性を変化させることがわかった (45)。これらの結果から、酵素によってアリル性基質結合領域の構造が違うことが示唆された。

1996 年に Tarshis らは、FARM 上流 4 番目と 5 番目を小さな残基のアミノ酸に置換した変異型ヒナドリ由来 FPP 合成酵素が、主生成物として  $C_{30}$ – $C_{45}$  を与え、 $C_{45}$  よりも長鎖プレニルニリン酸も少量生成することを報告した (46)。その報告の中で、彼らは基質アナログが結合した酵素の結晶構造を解析し、伸長するプレニル鎖が FARM 上流 4 番目と 5 番目のアミノ酸側鎖と直接作用することも示した。変異導入の位置の 1 つがこの章で作製した変異型酵素とは異なるが、このヒナドリの酵素で得られた結果はここで示した鎖延長機構を支持しており、加えて、真核生物の FPP 合成酵素の FARM 上流の構造は真正細菌の FPP 合成酵素や古細菌の GGPP 合成酵素とはわずかに異なることも示すものであった。



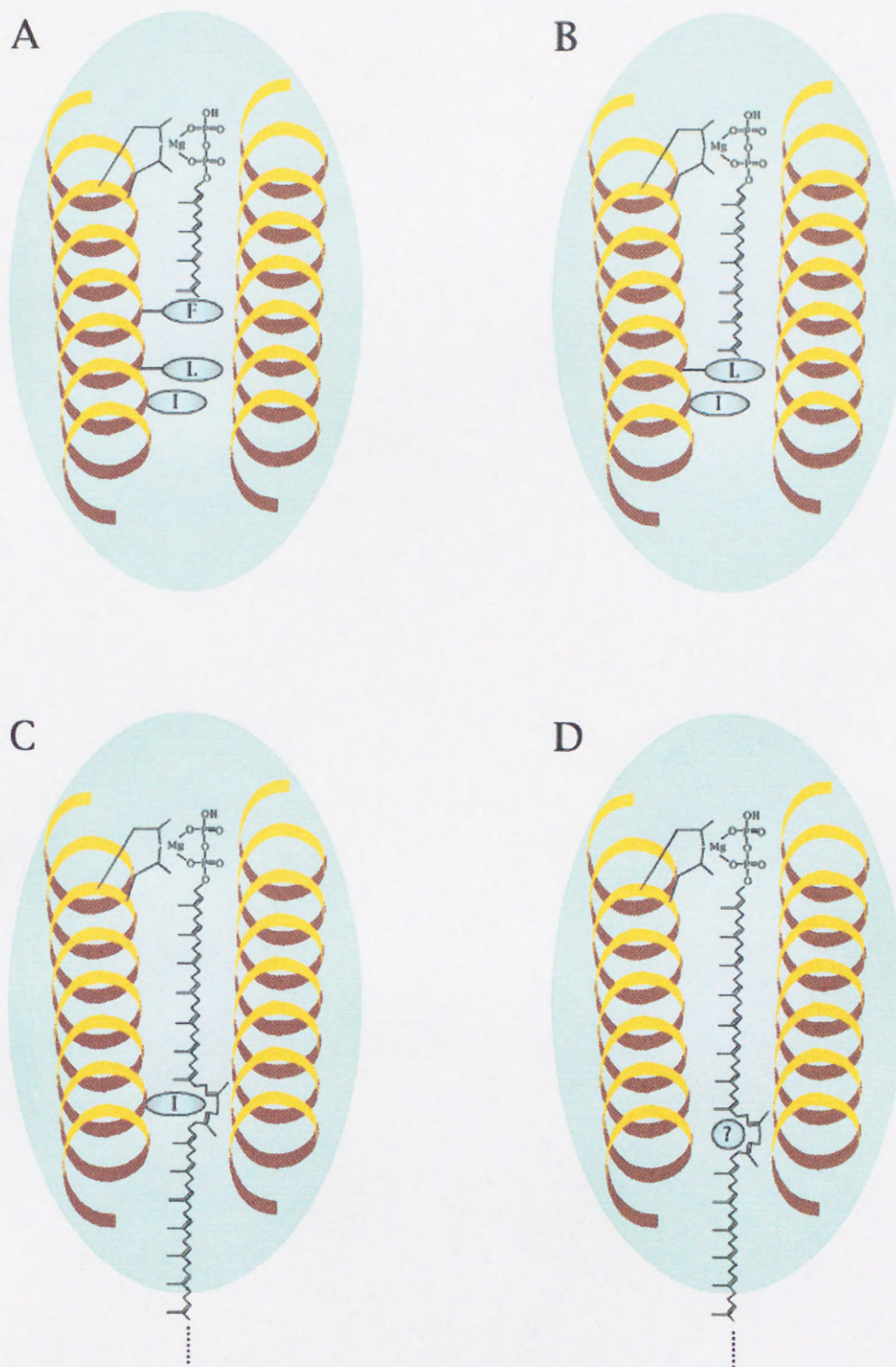


図 4-9 野生型および変異型 GGPP 合成酵素の鎖延長機構モデル

A: 野生型 GGPP 合成酵素

B: 1つの置換をもつ変異型 GGPP 合成酵素

C: 2つの置換をもつ変異型 GGPP 合成酵素

D: 3つの置換をもつ変異型 GGPP 合成酵素



## 参考文献

1. Poulter, C. D. and Rilling, H. C. (1982) in *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds*, (Spurgeon, S. L. and Porter J. W., eds) pp. 161-224, John Wiley & Sons, New York.
2. Heide, L. and Berger, U. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* **273**, 331-338.
3. Croteau, R. (1982) in *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds*, (Spurgeon, S. L. and Porter J. W., eds) pp. 225-282, John Wiley & Sons, New York.
4. Ogura, K. and Koyama, T. (1997) in *Dynamic Aspects of Natural Products Chemistry* (Ogura, K. and Sankawa, U., eds) pp. 1-23. Kodansha Press, Tokyo.
5. Tanaka, Y., Nunogaki, K., Kageyu, A., Mori, M., and Sato, Y. (1988) *J. Nat. Rubb. Res.* **3**, 177-183.
6. Tanaka, Y. (1989) *J. Appl. Polym. Sci.* **44**, 1-9.
7. Clarke, C. F., Tanaka, R. D., Svenson, K., Wamsley, M., Fogelman, A. M., and Edwards, P. A. (1987) *Mol. Cell. Biol.* **7**, 3138-3146.
8. Anderson, M. S., Yarger, J. G., Burck, C. L., and Poulter, C. D. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 19176-19184.
9. Fujisaki, S., Hara, H., Nishimura, Y., Horiuchi, K., and Nishino, T. (1990) *J. Biochem. (Tokyo)* **108**, 995-1000.
10. Koyama, T., Obata, S., Osabe, M., Takeshita, A., Yokoyama, K., Uchida, M., Nishino, T., and Ogura, K. (1993) *J. Biochem. (Tokyo)* **113**, 355-363.
11. Wilkin, D. J., Kutsunai, S. Y., and Edwards, P. A. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 4607-4614.
12. Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K., and Harashima, K. (1990) *J. Bacteriol.* **172**, 6704-6712.
13. Carattoli, A., Romano, N., Ballario, P., Morelli, G., and Macino, G. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 5854-5859.
14. Math, S. K., Hearst, J. E., and Poulter, C. D. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6761-6764.
15. Ohnuma, S., Suzuki, M., and Nishino, T. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 14792-14797.
16. Chen, A. and Poulter, C. D. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* **314**, 399-404.
17. Ashby, M. N. and Edwards, P. A. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 13157-13164.
18. Koike-Takeshita, A., Koyama, T., Obata, S., and Ogura, K. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 18396-18400.



19. Asai, K., Fujisaki, S., Nishimura, Y., Nishino, T., Okada, K., Nakagawa, T., Kawamukai, M., and Matsuda, H. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, 340-345.
20. Okada, K., Kamiya, Y., Zhu, X., Suzuki, K., Tanaka, K., Nakagawa, T., Matsuda, H., and Kawamukai, M. (1997) *J. Bacteriol.* **179**, 5992-5998.
21. Suzuki, K., Okada, K., Kamiya, Y., Zhu, X. F., Nakagawa, T., Kawamukai, M., and Matsuda, H. (1997) *J. Biochem. (Tokyo)* **121**, 496-505.
22. Chen, A., Kroon, P. A., and Poulter, C. D. (1994) *Protein Sci.* **3**, 600-607.
23. Joly, A. and Edwards, P. A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 26983-26989.
24. Tarshis, L. C., Yan, M., Poulter, C. D., and Sacchettini, J. C. (1994) *Biochemistry* **33**, 10871-10877.
25. Ohnuma, S., Hirooka, K., Ohto, C., and Nishino, T. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 5192-5198.
26. Ohnuma, S., Hirooka, K., Hemmi, H., Ishida, C., Ohto, C., and Nishino, T. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 18831-18837.
27. Ohnuma, S., Nakazawa, T., Hemmi, H., Hallberg, A.-M., Koyama, T., Ogura, K., and Nishino, T. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 10087-10095.
28. Ohnuma, S., Narita, K., Nakazawa, T., Ishida, C., Takeuchi, Y., Ohto, C., and Nishino, T. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 30748-30754.
29. Kunkel, T. A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 488-492.
30. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
31. Fujii, H., Koyama, T., and Ogura, K. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **712**, 716-718.
32. Ericsson, J., Scallen, T. J., Chojnacki, T., and Dallner, G. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 10602-10607.
33. Ohnuma, S., Koyama, T., and Ogura, K. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 23706-23713.
34. Takahashi, I. and Ogura, K. (1982) *J. Biochem. (Tokyo)* **92**, 1527-1537.
35. Cornish, K. (1993) *Eur. J. Biochem.* **218**, 267-271.
36. Baba, T. and Allen, C. M. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* **200**, 474-484.



37. Allen, C. M., Keenan, M. V., and Sack, J. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* **175**, 236-248.
38. Ohnuma, S., Koyama, T., and Ogura, K., (1992) *J. Biochem. (Tokyo)* **112**, 743-749.
39. Fujii, H., Koyama, T., and Ogura, K. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 14610-14612.
40. Takahashi, I., Ogura, K., and Seto, S. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 4539-4543.
41. Fujisaki, S., Nishino, T., and Katsuki, H. (1986) *J. Biochem. (Tokyo)* **99**, 1327-1337.
42. Sagami, H., Ogura, K., Seto, S. (1977) *Biochemistry* **16**, 4616-4622.
43. Ishii, K., Sagami, H., and Ogura, K. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **116**, 500-506.
44. Brems, D. N., Bruenger, E., and Rilling, H. C. (1981) *Biochemistry* **20**, 3711-3718.
45. Ohnuma, S., Hemmi, H., Ohto, C., Nakane, H., and Nishino, T. (1997) *J. Biochem. (Tokyo)* **121**, 696-704.
46. Tarshis, L. C., Proteau, P. J., Kellogg, B. A., Sacchettini, J. C., and Poulter, C. D. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 15018-15023.



## 第 5 章 *Sulfolobus acidocaldarius* ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素の 114 位のヒスチジンが生成物鎖長制御に果たす役割

### 5-1 緒論

古細菌の細胞膜はエーテル結合膜脂質で構成されている。この構造は真正細菌および真核生物の細胞膜成分であるエステル結合膜脂質よりも強固であるので、高温あるいは極端な pH といった過酷な条件下で古細菌が生育できる一因と考えられている (1)。この膜脂質生合成における重要な前駆物質が、ゲラニルゲラニルニリン酸 (GGPP、 $C_{20}$ ) である (2)。GGPP は、ジフィタニルグリセリル化タンパク質 (3, 4) や糖輸送脂質であるウンデカプレノール (辺見ら投稿中) の生合成にも利用されており、古細菌におけるイソプレノイド生合成経路の中心に位置している。

好熱好酸性古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius* 由来 GGPP 合成酵素 (EC 2.5.1.29) は、ジメチルアリルニリン鎖 (DMAPP、 $C_5$ )、ゲラニルニリン酸 (GPP、 $C_{10}$ )、ファルネシルニリン酸 (FPP、 $C_{15}$ ) といったアリル性基質にイソペンテニルニリン酸 (IPP、 $C_5$ ) をトランスの立体化学で順次縮合させ、GGPP ( $C_{20}$ ) を最終生成物として与える (5, 6)。

我々と他のグループの研究から、*S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素を含む短鎖プレニルニリン酸合成酵素に関して、鎖延長と停止の過程が以下のように進行することが明らかとなった。まず、アリル性基質のニリン酸基が、アスパラギン酸に富む最初のモチーフ (First Aspartate-Rich Motif, FARM) のアスパラギン酸に  $Mg^{2+}$  を介して結合し、酵素内の  $\alpha$ -ヘリックスに囲まれた疎水性ポケットの中へ、プレニル鎖が IPP の縮合に伴って伸長する (7, 8)。次いで、FARM 上流の嵩高いアミノ酸側鎖とプレニル鎖の  $\omega$  末端とが直接作用し、決められた鎖長で正確に伸長反応が停止する (9-11)。*S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素では、FARM 上流の嵩高いアミノ酸残基の小さな残基への置換が疎水性ポケットを拡大させ、 $C_{20}$  よりも長鎖の生成物を与えることがわかった (12)。

我々のグループは以前の研究で、*S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素と *Bacillus stearothermophilus* FPP 合成酵素に関して、FARM 上流以外に位置するアミノ酸のいくつか、生成物鎖長制御に影響することも報告した (10, 13)。しかし、これらのアミノ酸が鎖長制御機構にどのように関与するかは明らかではなかった。

第 5 章では、Tarshis らによって決定されたヒナドリ由来 FPP 合成酵素の立体構造 (7) を鋳型にして、*S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素の三次元構造モデルを構築し、第 4 章での結果からわかった、この酵素においてプレニル鎖の伸長を妨げるアミノ酸を指し示したことから述べる (12)。構造モデルでのこれらのアミノ酸の空間的配置により、疎水性ポケットが拡張した変異型 GGPP 合成酵素では、プレニル鎖が酵素内の折れ曲がった通路を通過することが示唆された。また、この構造モデルから考えると、77 位のフェニルアラニンと 114 位のヒスチジンを小さな残基に置換すれば、酵素内にプレニル鎖の通過のための直線状の通路が形成され、そのような変異型酵素は長鎖生成物を効率的に与えると予想された。この可能性について検討するために、77 位または 114 位を、あるいは両方を小さな残基のアミノ酸に置換した変異型 GGPP 合成酵素を作製し、これらの生成物分析を行った。



*S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素において、114 位のヒスチジンは 118 位のフェニルアラニンと同じ $\alpha$ -ヘリックス上にあると推定される。第 2 章で述べたように、118 位に置換をもつ変異型 GGPP 合成酵素は、C<sub>20</sub> に加え少量の C<sub>25</sub> を生成した (10)。さらに、*B. stearothermophilus* FPP 合成酵素では、157 位のバリンの変異が生成物特異性を変えることが我々のグループにより報告された (13)。157 位のバリンが存在する領域は、*S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素の 114 位と 118 位を含む領域に対応する。この章で述べる結果が、FARM 上流以外に存在するこれらのアミノ酸が鎖長制御機構に果たす役割を知る手がかりになると思われる。



## 5-2 実験方法

### 試料

逆相 TLC プレート LKC18 は Whatman 社から、HPTLC プレート RP-18 は Merck 社から購入した。(all-*E*)-FPP、(all-*E*)-GGPP、GPP、DMAPP は東北大学反応化学研究所小倉研究室で合成されたものを使用した(6)。 $[1-^{14}\text{C}]$ IPP は Amersham Pharmacia Biotech 社から購入した。他の全ての試薬は市販の特級品を使用した。プラスミド pBS-GGPS については第2章で述べた(10)。

### GGPP 合成酵素の分子モデリング

ヒナドリ由来 FPP 合成酵素の立体構造(7)を鋳型にして、Insight II Homology software (Biosym Technologies 社)(14)を用いて、*S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素の三次元構造モデルを構築した。次いで、Insight II Discover 3 software (Biosym Technologies 社)を用いて構造モデルを最小エネルギー状態になるように修正した。

### DNA シーケンス

変異型 GGPP 合成酵素の塩基配列は Perkin Elmer 社のモデル 373 DNA シーケンサーを用いたジデオキシ法によって確認した。

### 変異型 GGPP 合成酵素の作製

Kunkel 法によって *S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素遺伝子に部位特異的変異を導入した(15)。野生型 GGPP 合成酵素をコードするプラスミド pBS-GGPS から dU を含む一本鎖 DNA を調製し、それを鋳型として以下の合成オリゴヌクレオチドを使って3種類の変異型 GGPP 合成酵素遺伝子を作製した。太字は置換された塩基を、下線は新たに導入された制限酵素部位を表す。

プラスミド 合成オリゴヌクレオチド

pGGPS-L15 oligo-F77G, 5'-CATACTGGTACGCTTGTTCATGATG-3'

pGGPS-L18 oligo-H114A, 5'-ATATTAGCTGGAGATCTACTAGCTGCAAAGGCT-3'

pGGPS-L19 oligo-H114G, 5'-ATATTAGCTGGAGATCTACTAGGTGCAAAGGCT-3'

さらに dU を含む pGGPS-L15 の一本鎖 DNA を鋳型に、合成オリゴヌクレオチド oligo-H114A と oligo-H114G を用いて Kunkel 法によって、プラスミド pGGPS-L16 および pGGPS-L17 をそれぞれ作製した。

### 変異型 GGPP 合成酵素の調製

第2章で述べた方法に従って、作製したプラスミドで形質転換した大腸菌 XL1-Blue 株から熱処理した粗酵素抽出液を調製した(10-12)。

### プレニルニリン酸合成酵素活性の測定と生成物分析

調製した変異型 GGPP 合成酵素について、第2章で述べた方法に従ってプレニルニリン酸合成酵素活性を測定し、生成物分析を行った(10-12)。ただし、assay mixture



は以下の組成のものを使用し、生成物の抽出を 1 ml 水飽和ブタノールで行い、抽出液 200  $\mu$ l (1/5 量) を放射エネルギー測定に用い、残りの生成物を第 2 章および第 4 章で述べた方法に従って逆相 TLC で分析した (10-12)。長鎖生成物 ( $>C_{60}$ ) の鎖長決定のためには、2 ml の反応溶液から得られた生成物を用いた。

assay mixture (total volume 200  $\mu$ l)

MgCl <sub>2</sub>	1 $\mu$ mol
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /KOH, pH 5.8	2 $\mu$ mol
allylic substrate	25 nmol
[1- <sup>14</sup> C]IPP(1 Ci/mol)	25 nmol
Triton X-100	0.1%
crude enzyme	a suitable amount



### 5-3 結果と考察

#### GGPP 合成酵素の分子モデリング

我々のグループは *S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素をほぼ単一に精製したが（加藤ら未発表）、立体構造解析のための結晶化には至らなかった。そこで、生成物特異性を与える構造の情報を得るために、Tarshis らによって決定されたヒナドリ由来 FPP 合成酵素の立体構造（7）をもとに、*S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素の三次元構造モデルを構築した（図 5-1）。*S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素とヒナドリ由来 FPP 合成酵素は、同様の縮合反応を触媒し、アミノ酸一次配列の比較的高い類似性（41%）を示すので、構築したモデルは実際の構造にある程度近いと考えられる。この構造モデルでは、FARM 内の 2 つのアスパラギン酸と、その上流にある 77 位のフェニルアラニン、74 位のロイシン、71 位のイソロイシンとが折れ線上に存在する。FARM 周辺で縮合反応が起こり（7, 8）、FARM 上流のこれら 3 つの嵩高い残基がプレニル鎖の伸長を妨げること（12）が以前の研究で明らかにされている。77 位、74 位、71 位をすべてグリシンに置換した変異型 GGPP 酵素では、 $C_{40}$  のプレニル二リン酸が長鎖主生成物として得られた（12）。立体構造モデルから、これらの嵩高い側鎖を除くことで酵素内に折れ曲がった通路が形成され、その中をプレニル鎖が通過すると推測された（図 5-2）。加えて、立体構造モデルでは、FARM 内の 2 つのアスパラギン酸、77 位のフェニルアラニン、そして 114 位のヒスチジンが直線状に存在する。これらのアミノ酸の空間配置から、77 位と 114 位を小さな残基のアミノ酸に置換した変異型酵素は、内部にプレニル鎖の通過のための直線状の通路をもち、長鎖生成物を効率的に与えると予想された。この可能性を調べるために、77 位または 114 位を、あるいは両方を小さな残基のアミノ酸に置換した変異型 GGPP 合成酵素を作製し、解析を行った（表 5-1）。



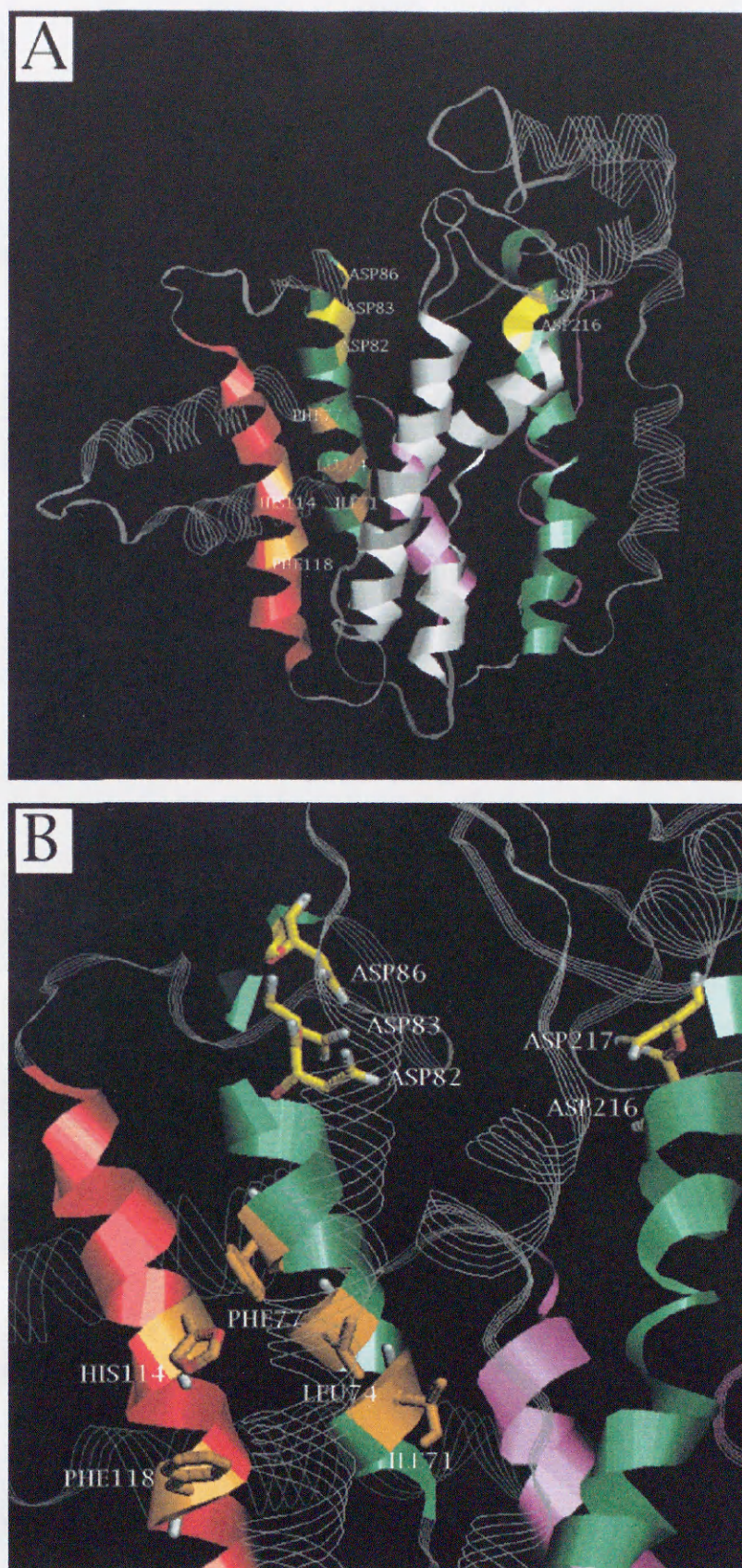


図 5-1 *S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素の三次元構造モデル  
(A) 全体の立体構造 (B) FARM 周辺領域の立体構造



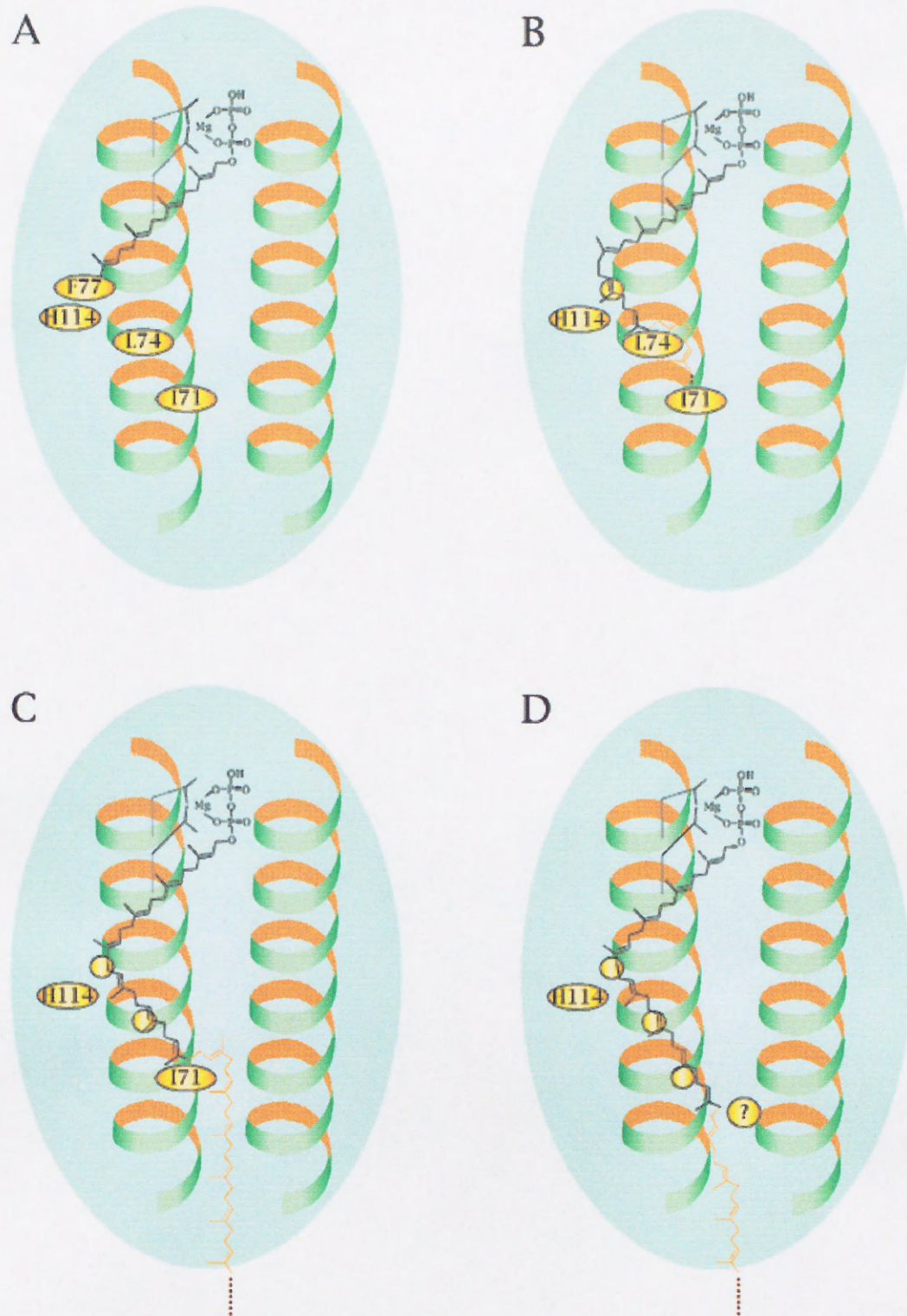


図 5-2 立体構造モデルから予想した野生型および変異型 GGPP 合成酵素の鎖延長機構

- A: 野生型 GGPP 合成酵素
- B: 1 つの置換をもつ変異型 GGPP 合成酵素
- C: 2 つの置換をもつ変異型 GGPP 合成酵素
- D: 3 つの置換をもつ変異型 GGPP 合成酵素



### 変異型 GGPP 合成酵素の活性測定

GGPS-L17 (F77G&H114G) を除くすべての変異型 GGPP 合成酵素は、野生型酵素と同等の比活性を示した (表 5-1)。GGPS-L17 の活性は野生型酵素の約 2-5%であったが、55°C で 15 時間の熱処理後も検出可能な活性を示した。

表 5-1 野生型および変異型 GGPP 合成酵素の活性

Enzyme	Specific activity (nmol/min/mg protein)			
	DMAPP	GPP	FPP	GGPP
GGPS (C <sub>20</sub> , Wild Type)	6.7	5.4	1.8	ND <sup>a</sup>
GGPS-L15 (C <sub>30</sub> , F77G)	8.7	3.1	2.3	0.15
GGPS-L16 (C <sub>45</sub> , F77G&H114A)	1.3	0.67	0.55	0.056
GGPS-L17 (C <sub>50</sub> , F77G&H114G)	0.12	0.11	0.083	0.039
GGPS-L18 (C <sub>30</sub> , H114A)	3.4	1.4	2.0	0.14
GGPS-L19 (C <sub>40</sub> , H114G)	4.3	0.94	0.65	0.19

括弧内に長鎖主生成物と変異を示す。<sup>a</sup>ND, not determined.

### 変異型 GGPP 合成酵素の生成物分析

変異型 GGPP 合成酵素の反応生成物を、酸性ホスファターゼで二リン酸基を加水分解後、逆相 TLC で分析した。125  $\mu$ M [1-<sup>14</sup>C]IPP と 125  $\mu$ M DMAPP を用いて酵素反応を行ったとき、野生型 GGPP 合成酵素は以前の報告と同様に C<sub>20</sub> (モル比 87%) をほぼ単一に与え、それよりも長鎖生成物は得られなかった。(6)。これとは対照的に、GGPS-L15 (F77G) は主に C<sub>30</sub> (33%) を生成し、GGPS-L16 (F77G&H114A) と GGPS-L17 (F77G&H114G) は、それぞれ C<sub>45</sub> (15%) と C<sub>50</sub> (4.6%) を長鎖主生成物 (>C<sub>20</sub>) として与えた (図 5-3A)。これらの結果から、77 位と 114 位の嵩高いアミノ酸側鎖の除去によって酵素内に形成された直線状通路を通してプレニル鎖が伸長し、また、2 つの置換をもつ変異型酵素の通路の方が 1 つの置換をもつ変異型酵素のものよりも長いことが示唆された。

1 つの置換をもつ変異型 GGPP 合成酵素、GGPS-L18 (H114A) と GGPS-L19 (H114G) は、野生型酵素と同じ深さの通路をもち、C<sub>20</sub> よりも長鎖は生成しないと考えられた。しかし予想に反して、GGPS-L18 (H114A) と GGPS (H114G) はそれぞれ C<sub>30</sub> (15%) と C<sub>40</sub> (10%) を長鎖主生成物として与えた (図 5-3A)。すべての変異型酵素に関して、同様の生成物分布が、GPP、FPP、GGPP をアリル性基質に用いた場合に観察された (図 5-3B)。

変異型酵素は、わずかではあるが極めて長鎖のプレニル二リン酸を生成したので、生成物の最大の鎖長を知るために長鎖プレノールの分離に適した条件で TLC 分析を行った (図 5-4)。その結果、GGPS-L15、GGPS-L16、GGPS-L17、GGPS-L18、GGPS-L19 は、それぞれ C<sub>85</sub>、C<sub>100</sub>、C<sub>90</sub>、C<sub>100</sub>、C<sub>100</sub> まで生成することが確認された。これらの極めて長鎖の炭化水素鎖は酵素内の通路から酵素の外へ押し出されて生成したと考えられる。



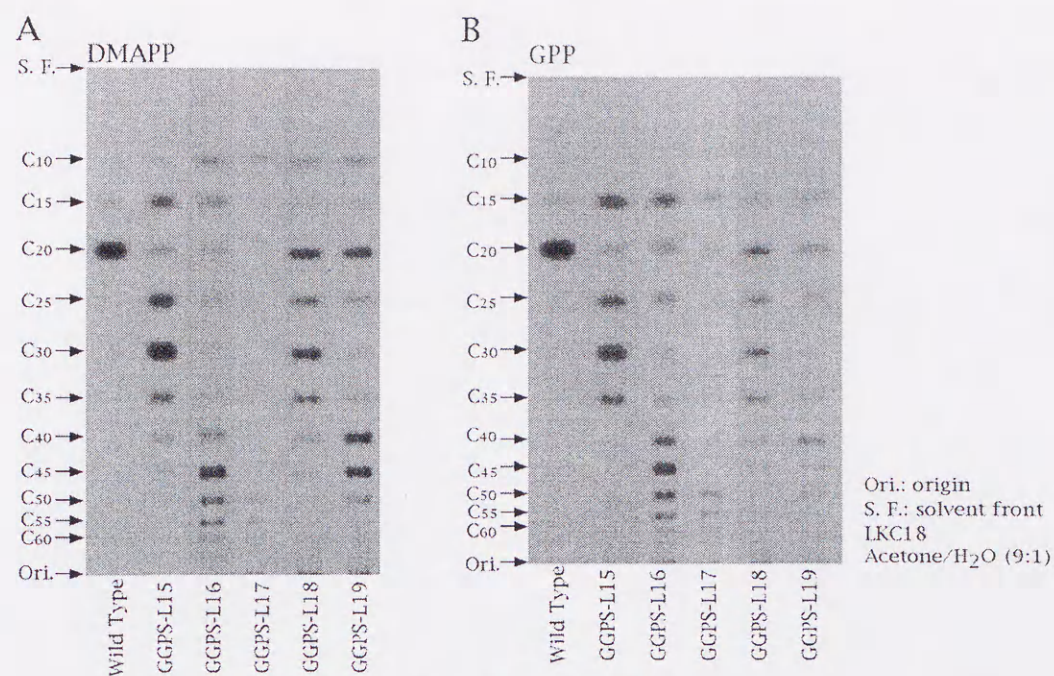


図 5-3 変異型 GGPP 合成酵素の生成物分析

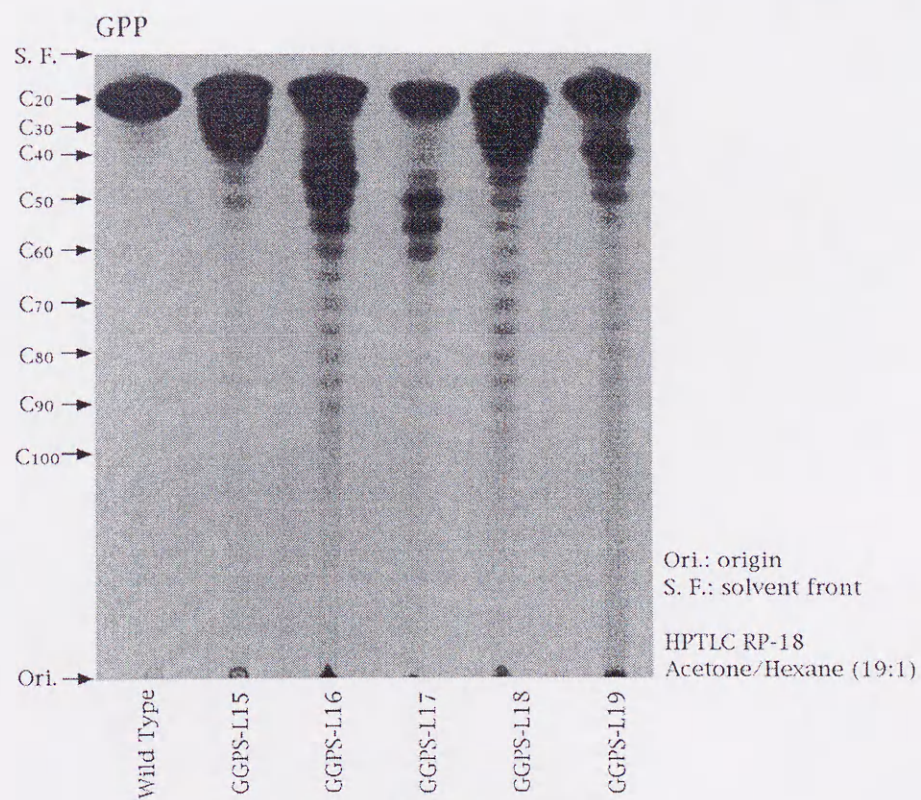


図 5-4 長鎖生成物の分析



### 114 位のヒスチジンが生成物鎖長制御に果たす役割

この章で述べたように、1つの置換をもつ変異型酵素、GGPS-L18 と GGPS-L19 は、予想に反して  $C_{20}$  よりも長鎖生成物を与えた。この結果を説明するのに、114 位のヒスチジンが関与する鎖長制御機構を 2 つ考えることができる。1 つは、野生型 GGPP 合成酵素において、114 位のヒスチジンが 77 位のフェニルアラニンとともにプレニル鎖を収容する疎水性ポケットの底の部分形成する「底機構」である (図 5-5A)。もう 1 つは、伸長するプレニル鎖に対面するように 77 位のフェニルアラニンの芳香環を 114 位のヒスチジンが固定するという「土台機構」である。この機構が正しいとすると、ヒスチジンが除かれた 1 つの置換をもつ変異型酵素では、芳香環が向きを変えてプレニル鎖を通過させ、その結果、鎖延長反応が停止しなくなると考えられる。計算より求めた GGPP 合成酵素の立体構造モデルはこの土台機構を支持している (図 5-5B)。 $C_{20}$  の生成物の割合は、GGPS-L15 (F77G) に比べて GGPS-L18 (H114A) と GGPS-L19 (H114G) の方が多くなった (図 5-3A, B)。この結果は、生成物の一部が  $C_{20}$  に達した際に、77 位のフェニルアラニンと  $\omega$  末端で相互作用することを示唆している。この相互作用の可能性はここで示した 2 つの機構と矛盾していない。

この章で示した結果から、*S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素の 114 位のヒスチジンが果たす役割を正確に把握することはできなかったが、このアミノ酸が生成物の炭化水素鎖を収容する疎水性ポケットの形成に重要であることはわかった。第 2 章で述べた結果より、118 位のフェニルアラニンが生成物鎖長制御に影響することがわかったが (10)、118 位のフェニルアラニンは 114 位のヒスチジンに作用し、それによって鎖長制御機構に関わっているのかもしれない (図 5-1)。これらのアミノ酸の機能解明には結晶構造解析等をさらに進めることが不可欠であると思われる。



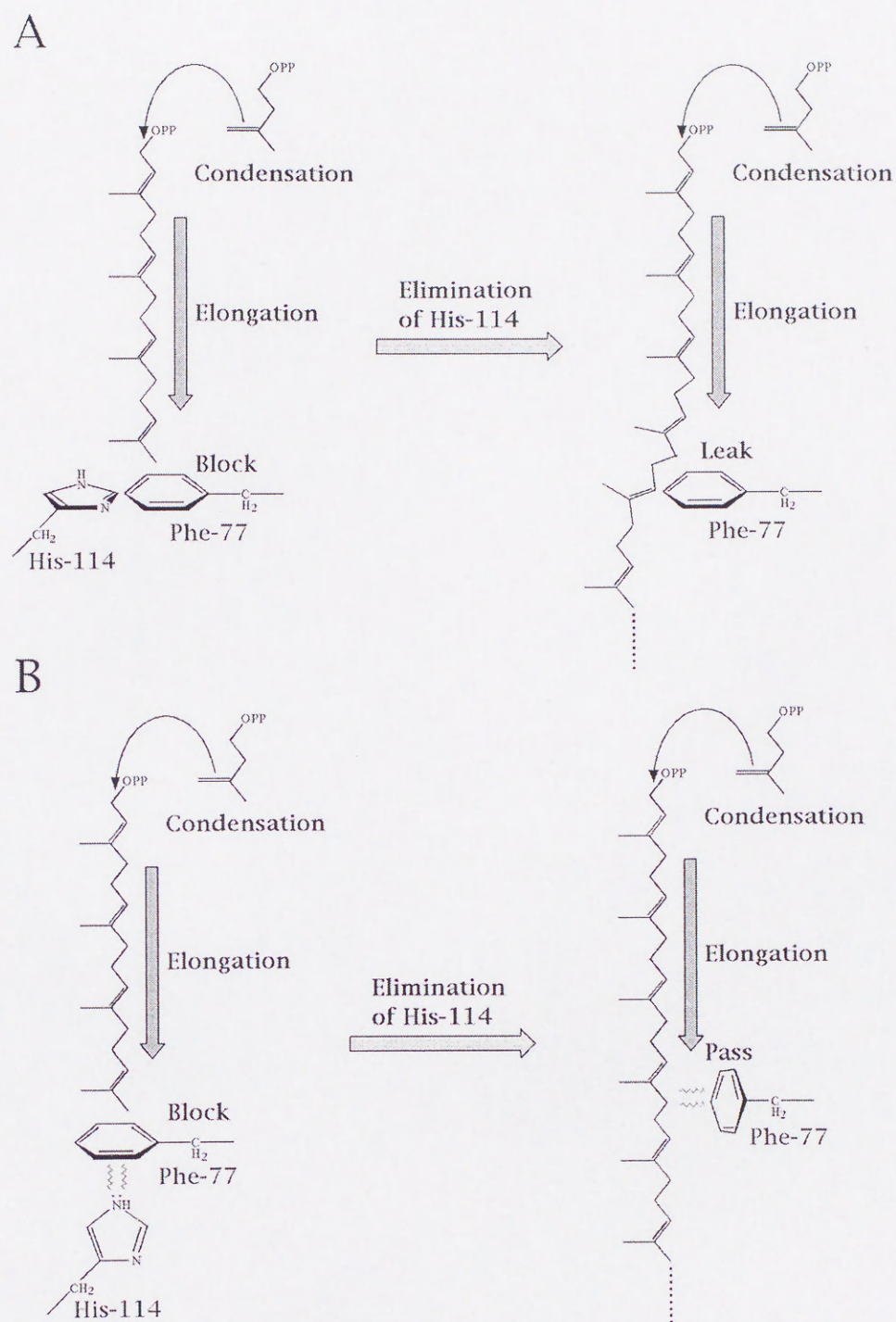


図 5-5 生成物鎖長制御において 114 位のヒスチジンが果たす役割

(A) 底機構 (B) 土台機構



## 参考文献

1. Rosa, M. D., and Gambacorta, A. (1988) *Prog. Lipid Res.* **27**, 153-175.
2. Chen, A., Zhang, D., and Poulter, C. D. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 21701-21705.
3. Sagami, H., Kikuchi, A., and Ogura, K. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 14851-14854.
4. Kikuchi, A., Sagami, H., and Ogura, K. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 18011-18016.
5. Ogura, K. and Koyama, T. (1998) *Chem. Rev.* **98**, 1263-1276.
6. Ohnuma, S., Suzuki, M., and Nishino, T. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 14792-14797.
7. Tarshis, L. C., Yan, M., Poulter, C. D., and Sacchettini, J. C. (1994) *Biochemistry* **33**, 10871-10877.
8. Tarshis, L. C., Proteau, P. J., Kellogg, B. A., Sacchettini, J. C., and Poulter, C. D. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 15018-15023.
9. Ohnuma, S. and Wang, K. (1999) *Trends Biochem. Sci.* **24**, 445-451.
10. Ohnuma, S., Hirooka, K., Hemmi, H., Ishida, C., Ohto, C., and Nishino, T. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 18831-18837.
11. Ohnuma, S., Hirooka, K., Ohto, C., and Nishino, T. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 5192-5198.
12. Ohnuma, S., Hirooka, K., Tsuruoka, N., Yano, M., Ohto, C., Nakane, H., and Nishino, T. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 26705-26713.
13. Ohnuma, S., Nakazawa, T., Hemmi, H., Hallberg, A. M., Koyama, T., Ogura, K., and Nishino, T. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 10087-10095.
14. Dayringer, H. E., Tramontano, A., Sprang, S. R., and Fletterick, R. J. (1986) *J. Mol. Graphics* **4**, 82-87.
15. Kunkel, T. A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 488-492.



## 第 6 章 中鎖プレニルニリン酸合成酵素の生成物鎖長決定機構

### 6-1 緒論

プレニルニリン酸合成酵素はアリル性基質へのイソペンテニルニリン酸 (IPP、 $C_5$ ) の縮合反応を触媒し、立体化学が異なる様々な鎖長の直鎖状炭化水素化合物を生成する。これらの化合物は、モノテルペン、ステロイド、カロテノイド、プレニルキノン、糖輸送脂質、プレニル化タンパク質などの多彩なイソプレノイド化合物の生合成に利用されている (1)。

小倉らのグループによると、プレニルニリン酸合成酵素は、酵素の四次構造と生成物鎖長およびその立体化学から、*E* 型短鎖、*E* 型中鎖、*E* 型長鎖、*Z* 型長鎖プレニルニリン酸合成酵素の 4 種類のグループに分類される (2) (図 6-1)。短鎖プレニルニリン酸合成酵素はホモダイマーを形成し、ジメチルアリルニリン酸 (DMAPP、 $C_5$ )、ゲラニルニリン酸 (GPP、 $C_{10}$ )、ファルネシルニリン酸 (FPP、 $C_{15}$ ) といったアリル性基質に IPP を連続的にトランス (*E*) の立体化学で縮合させて FPP あるいはゲラニルゲラニルニリン酸 (GGPP、 $C_{20}$ ) を生成する (3-6)。中鎖プレニルニリン酸合成酵素は、ヘキサプレニルニリン酸 ( $C_{30}$ ) あるいはヘプタプレニルニリン酸 (HepPP、 $C_{35}$ ) を生成し、*E* 型長鎖プレニルニリン酸合成酵素は、オクタプレニルニリン酸 (OPP、 $C_{40}$ )、ソラネシルニリン酸 (SPP、 $C_{45}$ )、デカプレニルニリン酸 ( $C_{50}$ ) を生成する。中鎖プレニルニリン酸合成酵素と *E* 型長鎖プレニルニリン酸合成酵素はともに短鎖プレニルニリン酸をアリル性基質に用いて同様の *E* 型縮合反応を触媒するが、中鎖プレニルニリン酸合成酵素の四次構造は特異的である。短鎖プレニルニリン酸合成酵素と同様に、*E* 型長鎖プレニルニリン酸合成酵素もホモダイマーを形成する (7-10)。これに対して、中鎖プレニルニリン酸合成酵素は解離可能な 2 つの異なるサブユニットで構成されている。これらのサブユニットの 1 つは、短鎖および *E* 型長鎖プレニルニリン酸合成酵素のものとの配列相同性を示し、7 つの保存領域をもつ。これらの保存領域には、基質結合部位であるアスパラギン酸に富む 2 つのモチーフが含まれている。もう 1 つのサブユニットには、他のイソプレノイド合成酵素と相同性のある配列が全く存在しない (11-13)。

プレニルニリン酸合成酵素に共通する性質として、酵素ごとに決められた長さで鎖延長反応が正確に終結するということがあげられる。しかし、これらの酵素がどのようにして生成物鎖長を正確に制御するかについては、短鎖プレニルニリン酸合成酵素を除いて不明であった。短鎖プレニルニリン酸合成酵素では、変異型酵素を用いた研究と、基質アナログが結合したヒナドリ由来 FPP 合成酵素の三次元立体構造から、生成物鎖長制御機構の概要が明らかとなった。ヒナドリ由来 FPP 合成酵素の立体構造から、短鎖プレニルニリン酸合成酵素は  $\alpha$ -ヘリックスがループでつながった構造の中央に  $\alpha$ -ヘリックスで囲まれた疎水性キャビティを形成し、このキャビティ内のアスパラギン酸に富む最初のモチーフ (First Aspartate-Rich Motif, FARM) のアスパラギン酸に  $Mg^{2+}$  を介してアリル性基質のニリン酸基が結合することが示唆された (14, 15)。また、変異型酵素を用いた研究から、IPP の縮合反応によって伸長するプレニル鎖の  $\omega$ -末端が、キャビティの底を形成する FARM 上流の嵩高いアミノ酸側鎖と直接作用して鎖延長反応が



正確に停止することが強く示唆された (15-20)。 *Sulfolobus acidocaldarius* GGPP 合成酵素と *Bacillus stearothermophilus* FPP 合成酵素では、FARM 上流 5 番目の芳香族アミノ酸がプレニル鎖延長を妨げることがわかった (16-18)。しかし、中鎖プレニルニリン酸合成酵素の生成物鎖長決定機構については未解明であった。

*B. stearothermophilus* HepPP 合成酵素は中鎖プレニルニリン酸合成酵素に分類される。この酵素の 2 つのサブユニットの 1 つである component II' は、短鎖プレニルニリン酸合成酵素と配列相同性を示し、FARM も含んでいる。もう一方のサブユニットである component I' は、他の中鎖プレニルニリン酸合成酵素の対応するサブユニットとしか配列相同性をもたない。これらの配列情報から、component II' 内の FARM 上流のアミノ酸が生成物鎖長を制御すると予想した。この仮説を確かめるために、component II' の FARM 上流にある 1 つのアミノ酸残基を置換した変異型酵素を数種類作製し、生成物分析を行った。この章で述べる結果から、すべての *E* 型プレニルニリン酸合成酵素が共通の機構で生成物鎖長を制御することが強く示唆された。

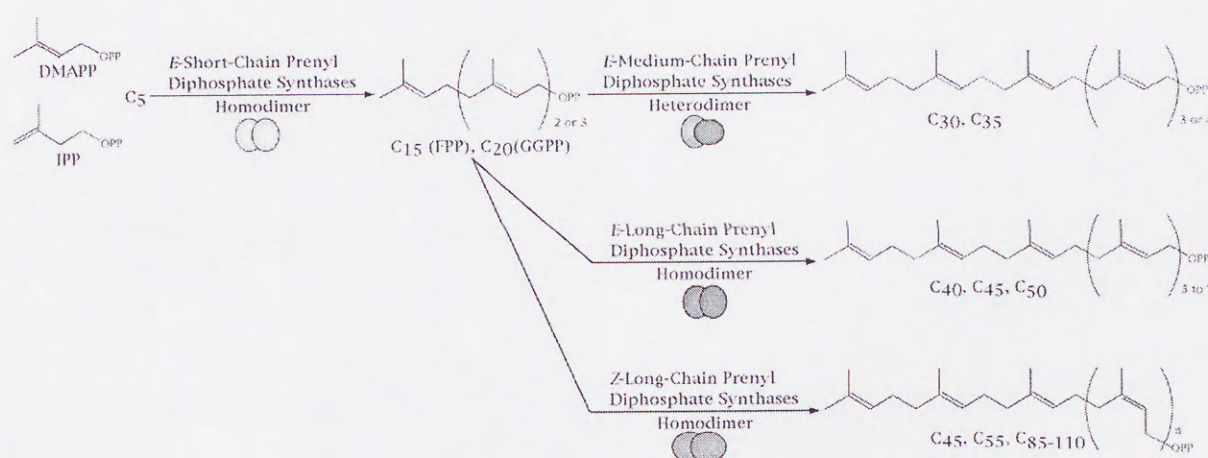


図 6-1 プレニルニリン酸合成酵素の分類

HepPP 合成酵素は中鎖プレニルニリン酸合成酵素に分類される。



## 6-2 実験方法

### 試料

[1-<sup>14</sup>C]IPP は Amersham Pharmacia Biotech 社から購入した。非放射標識 IPP、(all-*E*)-FPP、(all-*E*)-GGPP は東北大学反応化学研究所小倉研究室で合成されたものを使用した (5)。逆相 TLC プレート LKC18 は Whatman 社から購入した。酸性ホスファターゼは Roche 社から購入した。他の全ての試薬は市販の特級品を使用した。変異型 *B. stearothermophilus* HepPP 合成酵素発現系構築のために、以前に報告されたプラスミド、pAC2、pPR2、pTL7 を使用した (12, 21)。pAC2 と pTL7 は HepPP 合成酵素遺伝子クラスターをすべて含み、pPR2 はクラスターの一部、*heps-1* と *menG* を含んでいる (22)。

### 一般操作

制限酵素処理、形質転換等の標準的な分子生物学操作は、Sambrook らの方法に従って行った (23)。

### 変異型 HepPP 合成酵素発現系の構築

PCR 法によって HepPP 合成酵素 component II' に部位特異的変異導入を行った。まず、プラスミド pAC2 を鋳型に 1 組のプライマー (AC-, HPP10) を用いて PCR を行い、完全長 component II' 遺伝子 (*heps-2*) を増幅した。増幅した断片を pT7Blue T-Vector (Novagen 社) に組み込み、プラスミド pTAH を作製した。

#### プライマー

AC-, 5'-CTCTAGAGGATCCCCGACAAGCTCGCCG-3'

HPP10, 5'-GGTGAACATCATGAAGTTAAAGGCG-3'

太字はミスマッチを、下線は新たに導入された *Bsp*HI サイトを表す。

次いで、component II' に 1 つのアミノ酸置換を導入するために、pAC2 を鋳型として、リバースプライマーに AC-を、フォワードプライマーに以下のものを用いて PCR を行い、増幅された変異 *heps-2* 遺伝子 3'側断片を pT7Blue T-Vector に組み込み、プラスミド、pTA(I76G)、pTA(A79Y)、pTA(S80F)をそれぞれ作製した。

#### プラスミド フォワードプライマー

pTA(I76G) I76G+, 5'-CGCTCGAGCTCGGTCACATGGCTTCGCTCG-3'

pTA(A79Y) A79Y+, 5'-CGCTCGAGCTCATTACATGTATTCGCTCG-3'

pTA(S80F) S80F+, 5'-CGCTCGAGCTCATTACATGGCTTTTCTCG-3'

太字はミスマッチを、下線は *Xho*I サイトを表す。これらのプライマーの使用によって、サイレント変異で *Nde*I サイトが除かれる。

作製した pTA(I76G)、pTA(A79Y)、pTA(S80F)から、変異 *heps-2* 遺伝子 3'側断片を *Xho*I-*Sph*I で切り出した。これらの断片を *Xho*I-*Sph*I で切断した pTAH ベクターに連結して、プラスミド、pHEPS(I76G)、pHEPS(A79Y)、pHEPS(S80F)をそれぞれ作製



した。これらのプラスミドから、完全長の変異 *heps-2* 遺伝子を *Bam*HI で切り出し、*Bam*HI で切断した pPR2 ベクターに組み込み、変異 HepPP 合成酵素発現プラスミド、pTL7(I76G)、pTL7(A79Y)、pTL7(S80F)をそれぞれ作製した。モデル 373 DNA シークエンサー (Perkin Elmer 社) を用いたジデオキシ法によって変異導入を確認した。

### 変異型 HepPP 合成酵素の調製

プラスミド、pTL7、pTL7(I76G)、pTL7(A79Y)、pTL7(S80F)は、野生型 component I' と野生型または変異型 component II' をコードしている。これらのプラスミドを用いて大腸菌 JM109 株を形質転換し、培養、集菌を行った。菌体を sonication buffer で懸濁後、超音波破碎し、55°C で 20 分間熱処理を行い、宿主由来の酵素を失活させた。10000 x g で 20 分間遠心分離後、得られた上清を粗酵素抽出液として活性測定に使用した (12, 21)。

#### sonication buffer for *B. stearrowthermophilus* HepPP synthase

25 mM	Tris/HCl, pH 8.5
10 mM	$\beta$ -mercaptoethanol
1 mM	EDTA

### プレニルニリン酸合成酵素活性の測定と生成物分析

調製した野生型および変異型 HepPP 合成酵素について、第 2 章で述べた方法に従ってプレニルニリン酸合成酵素活性を測定し、生成物分析を行った (18-20, 24)。ただし、assay mixture は以下の組成のものを使用した (12, 21)。

#### assay mixture for *B. stearrowthermophilus* HepPP synthase

(total volume 1 ml)

MgCl <sub>2</sub>	10 $\mu$ mol
Tris-HCl, pH 8.5	50 $\mu$ mol
NH <sub>4</sub> Cl	50 $\mu$ mol
$\beta$ -mercaptoethanol	50 $\mu$ mol
allylic substrate	25 nmol
[1- <sup>14</sup> C]IPP(1 Ci/mol)	25 nmol
Triton X-100	0.25%
crude enzyme	a suitable amount

### HepPP 合成酵素の分子モデリング

ヒナドリ由来 FPP 合成酵素の立体構造 (14) を鋳型にして、Insight II Homology software (Biosym Technologies 社) (25) を用いて、*B. stearrowthermophilus* HepPP 合成酵素 component II' の三次元構造モデルを構築した。次いで、Insight II Discover 3 software (Biosym Technologies 社) を用いて構造モデルを最小エネルギー状態になるように修正した。



### 6-3 結果

#### HepPP 合成酵素における生成物鎖長決定に必須のアミノ酸の探索

*B. stearothermophilus* HepPP 合成酵素は2つの異なるサブユニット、component I' と II' で構成される。component II' は短鎖プレニル二リン酸合成酵素と配列相同性を示すので、このサブユニットが、基質結合部位と反応触媒部位だけでなく、生成物鎖長制御領域も保持すると予想された。そこで、component II' が短鎖プレニル二リン酸合成酵素と同じ方式で生成物鎖長を制御するか否かを確かめるために、短鎖合成酵素で得られた情報をもとに数種類の変異型 component II' を作製し、野生型 component I' とともに用いて生成物特異性を調べた。

変異導入の位置と置換するアミノ酸の種類は、以下の情報と仮定に基づいて行った。アリル性基質の二リン酸基は、 $Mg^{2+}$  を介して FARM のアスパラギン酸残基に結合する。ヒナドリ由来 FPP 合成酵素で報告されたように、component II' の FARM 周辺領域も  $\alpha$ -ヘリックスを形成する (14, 15)。この  $\alpha$ -ヘリックスに沿うようにしてプレニル鎖が伸長する。 $\alpha$ -ヘリックス上の小さな残基のアミノ酸はプレニル鎖を通過させ、それよりも FARM から離れた位置の嵩高いアミノ酸残基が、短鎖合成酵素の場合と同じようにして鎖延長反応を停止させる (15-19)。これらのアミノ酸側鎖はプレニル鎖が通過する空間に面している。

第4章で述べたように、変異型 FPP 合成酵素と変異型 GGPP 合成酵素において、伸長するプレニル鎖の  $\omega$ -末端が FARM 上流8番目の残基と直接作用することが強く示唆された (20)。そこで、component II' の FARM 上流8番目にある76位のイソロイシンをグリシンに置換した変異型酵素を作製した (図6-2)。野生型酵素において、このイソロイシンが鎖延長を妨げるのであるならば、76位をグリシンに置換した変異型酵素は  $C_{35}$  よりも長鎖生成物を与えると予想された。

また、我々と他のグループの研究 (15-17)、および第2章と第3章で述べた結果 (18, 19) から、FPP 合成酵素と GGPP 合成酵素において、FARM 上流4番目と5番目の嵩高いアミノ酸がプレニル鎖延長を妨げ、鎖長制御に重要であることがわかった。component II' とこれらの短鎖プレニル二リン酸合成酵素との相同性から、component II' の FARM 上流4番目と5番目の79位のアラニンと80位のセリンはプレニル鎖が通過する空間に面すると考えられる。そこで、これらの位置に嵩高いアミノ酸を導入した変異型 HepPP 合成酵素を2種類作製した (図6-2)。これらの変異型酵素は、A79Y あるいは S80F という置換をそれぞれもつ。これらの変異型酵素が  $C_{35}$  よりも短い鎖長の生成物を与えるならば、野生型酵素においてこれらの位置が小さな残基であることが、 $C_{20}$  よりも長鎖の生成物を与えるために必須であるといえる。



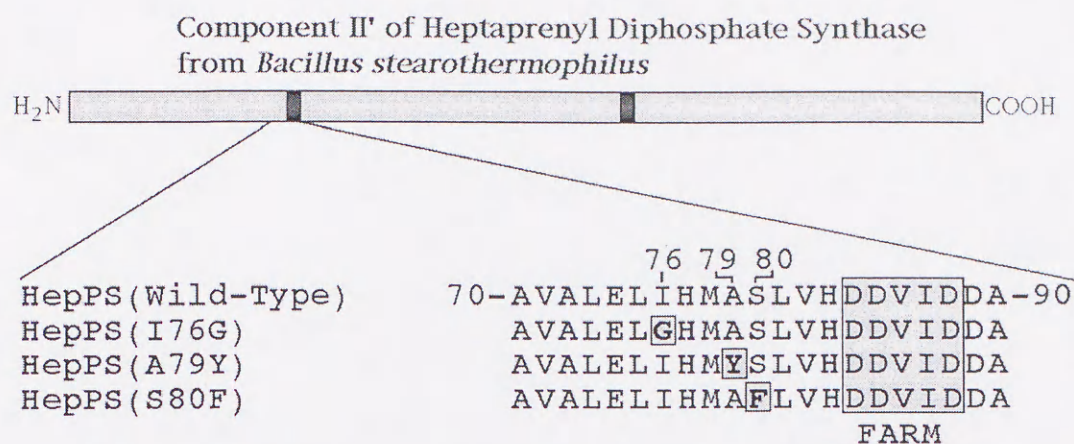


図 6-2 野生型および変異型 HepPP 合成酵素 component II' のアミノ酸配列

### 鎖延長を終結させる嵩高いアミノ酸の同定

I76G の置換をもつ変異型 HepPP 合成酵素の比活性を、1-ブタノールで抽出される生成物の放射エネルギーから決定した。この変異型酵素の比活性は野生型酵素とほぼ同等であった (表 6-1)。ブタノール抽出した生成物を酸性ホスファターゼで加水分解後、生じた各種プレノールの鎖長と量を逆相 TLC で分析した (図 6-3A、表 6-1)。25  $\mu$ M [1- $^{14}$ C]IPP と 25  $\mu$ M FPP を用いて酵素反応を行ったとき、野生型 HepPP 合成酵素は C<sub>35</sub> (モル比、73%) を主生成物として与え、C<sub>35</sub> よりも長鎖生成物は得られなかった。一方、I76G の変異型 HepPP 合成酵素は OPP (C<sub>40</sub>、21%) を多く生成し、SPP (C<sub>45</sub>、5.3%) も少量生成した。これらの結果から、野生型酵素において 76 位のイソロイシンが鎖延長反応を終結させるのに必須であり、76 位の嵩高い側鎖を除去した変異型酵素は HepPP に IPP をさらに縮合できることがわかった。25  $\mu$ M GGPP をアリル性基質に用いた場合、I76G の変異型 HepPP 合成酵素は SPP (33%) を主生成物として与え、OPP (21%) もある程度生成した。この反応条件において、野生型酵素はゲラニルファルネシル二リン酸 (GFPP、C<sub>25</sub>、59%) を主生成物として与え、生成物中の HepPP の割合は 37% となった。

表 6-1 野生型および変異型 HepPP 合成酵素の比活性と生成物分布

Enzyme	Primer substrate	Specific activity pmol/min/mg	Product distribution						
			C <sub>20</sub>	C <sub>25</sub>	C <sub>30</sub>	C <sub>35</sub>	C <sub>40</sub>	C <sub>45</sub>	C <sub>50</sub>
HepPS (WildType)	FPP	2.1	16	5.8	4.8	73	ND <sup>a</sup>	ND	ND
	GGPP	0.93	ND	59	4.1	37	ND	ND	ND
HepPS (I76G)	FPP	2.9	22	17	20	15	21	5.3	ND
	GGPP	0.58	ND	21	12	9.2	21	33	3.3
HepPS (A79Y)	FPP	1.8	97	3.3	ND	ND	ND	ND	ND
	GGPP	0.04	ND	100	ND	ND	ND	ND	ND
HepPS (S80F)	FPP	1.9	81	19	0.53	ND	ND	ND	ND
	GGPP	0.16	ND	92	7.7	ND	ND	ND	ND

<sup>a</sup>ND, not detected.



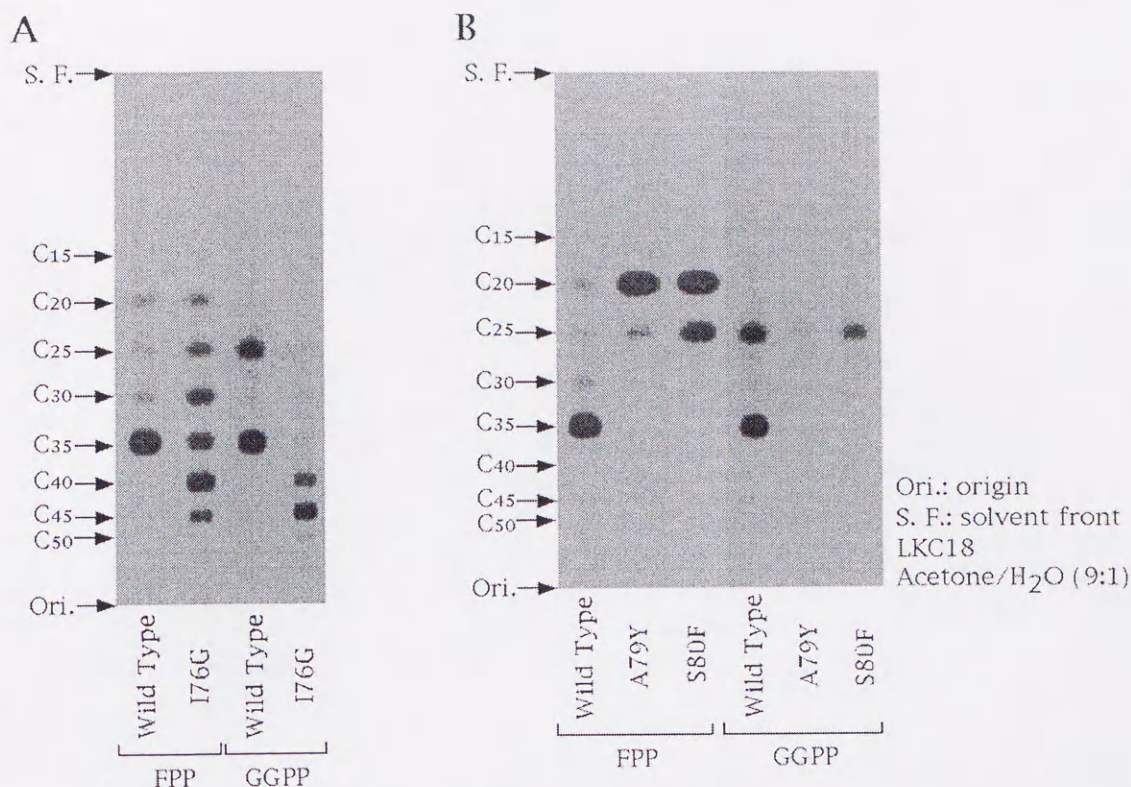


図 6-3 変異型 HepPP 合成酵素の生成物分析

### プレニル鎖を通過させる小さな側鎖のアミノ酸の同定

25  $\mu$ M [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]IPP と 25  $\mu$ M FPP を用いて酵素反応を行ったとき、A79Y あるいは S80F の置換をもつ変異型 HepPP 合成酵素は、野生型酵素と同程度の比活性を示した。しかし、25  $\mu$ M GGPP をアリル性基質に用いた反応では、これらの変異型酵素の比活性は野生型酵素よりも低い値を示した (表 6-1)。これらの結果は、79 位あるいは 80 位の芳香族アミノ酸への置換によって生成物特異性が変化し、主生成物として GGPP (C<sub>20</sub>) を与えることを示唆した。そこで、これらの変異型酵素の生成物鎖長を逆相 TLC で分析した (図 6-3B、表 6-1)。FPP をアリル性基質に用いたとき、A79Y 変異型酵素は、GGPP (97%) を主生成物とし、微量の GFPP (C<sub>25</sub>, 3.3%) を与えた。一方、この反応条件での S80F 変異型酵素の主生成物も GGPP (81%) となったが、この変異型酵素は GFPP (19%) もある程度生成した。GGPP をアリル性基質に用いた反応では、A79Y 変異型酵素はアリル性基質として GGPP をほとんど利用できなかったのに対して、S80F 変異型酵素はわずかな GFPP 合成活性を示した。これらの結果は、導入した芳香族アミノ酸が伸長するプレニル鎖にとって障害物として働くことを示した。また、野生型酵素ではこれらの位置の小さな残基がプレニル鎖を通過させ、C<sub>20</sub> よりも長鎖の生成を可能にすることが強く示唆された。79 位と 80 位付近を通過したプレニル鎖は、76 位のイソロイシンに達するまで伸長し続けると考えられる。



## 6-4 考察

この章で述べた結果から、中鎖プレニル二リン酸合成酵素に分類される *B. stearrowthermophilus* HepPP 合成酵素において、サブユニットの1つである component II' の FARM 上流領域が生成物鎖長制御に重要であることが明らかとなった。

I76G の置換をもつ変異型 HepPP 合成酵素は、野生型酵素の生成物鎖長の限界である  $C_{35}$  を超えて IPP を縮合させることができた (図 6-3A)。このことは、FARM 上流 8 番目の 76 位のイソロイシンが鎖延長反応の停止に必須である重要な証拠となった。野生型酵素において、どのようにして 76 位のイソロイシンは伸長反応を  $C_{35}$  で終結させるのであろうか。2つの鎖長制御機構を考えることができる。1つは、76 位のイソロイシンが疎水性ポケットの底の部分进行形成し、プレニル鎖の $\omega$ -末端と直接作用して伸長を妨げるという「ポケット機構」(図 6-4A)、もう1つは、このイソロイシンが IPP あるいはアリル性基質に作用して縮合反応を制限するという「留め金機構」である (図 6-4B)。

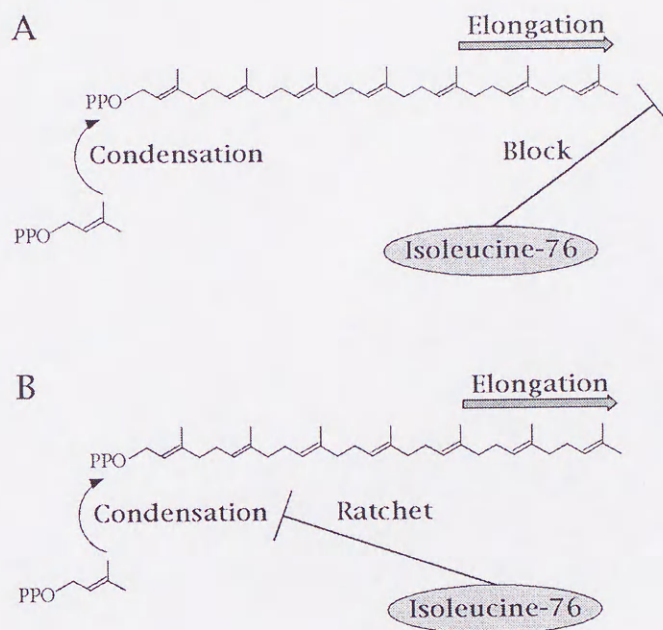


図 6-4 76 位のイソロイシンによる鎖長決定機構  
(A) ポケット機構 (B) 留め金機構

短鎖プレニル二リン酸合成酵素であるヒナドリ由来 FPP 合成酵素では、FARM 周辺領域は $\alpha$ -ヘリックスを形成することが報告されている (14)。component II' も対応する領域が $\alpha$ -ヘリックス構造をとるならば、76 位のイソロイシンと、79 位あるいは 80 位の芳香族アミノ酸は $\alpha$ -ヘリックス 1 周分離れていることになる。通常 $\alpha$ -ヘリックス 1 周は約 5.4 Å に相当する。しかし、野生型酵素と A79Y あるいは S80F の置換をもつ変異型酵素の主生成物は、それぞれ HepPP ( $C_{35}$ ) と GGPP ( $C_{20}$ ) である。それぞれの酵素において 76 位、79 位、80 位の嵩高い残基が鎖延長を妨げるとすると、76 位と、79 位あるいは 80 位のアミノ酸の距離は、HepPP と GGPP の鎖長の差である 3 イソプレニル単位 (約 15 Å) になるはずである。このアミノ酸間の距離の違いは、留め金機構を



支持するかもしれない。あるいは、component II'の FARM 周辺領域は $\alpha$ -ヘリックス構造ではないのかもしれない。そこで、この矛盾の原因を探るために、Tarshis らによって決定されたヒナドリ由来 FPP 合成酵素の立体構造 (14) をもとに INSIGHT II ソフトウェア (25) を用いて component II'の三次元立体構造モデルを構築した (図 6-5)。計算によって得られた構造モデルによると、FARM、76 位のイソロイシン、79 位のアラニン、80 位のセリンを含む反応触媒ドメイン周辺領域は、歪んだヘリックスを形成していた。そのために、76 位のイソロイシンと、79 位のアラニンあるいは 80 位のセリンとの間隔が大きく開いていた。算出された 10-12 Å という間隔は、3 イソプレン単位 (約 15 Å) に近いものであった。この構造モデルでの結果は、76 位のイソロイシンが疎水性ポケットの底にあって鎖延長を妨げるポケット機構を支持している (図 6-6A)。

I76G 変異型酵素は  $C_{50}$  よりも長鎖のプレニルニリン酸を生成しなかった (図 6-3A)、変異導入部位上流のアミノ酸がプレニル鎖のそれ以上の伸長を阻害することが考えられる (図 6-6B)。FARM 上流 11 番目にある 73 位のロイシンは、76 位から $\alpha$ -ヘリックス 1 周離れて存在する (図 6-5C)。FARM 上流 5 番目と 8 番目をともにグリシンに置換した変異型 *S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素では、 $C_{35}$  の鎖長のプレニルニリン酸が長鎖主生成物として得られた。また、これらの 2 つの置換に加えて FARM 上流 11 番目もグリシンに置換した変異型 GGPP 合成酵素では、長鎖主生成物が  $C_{40}$  となった (20)。この 3 番目の変位導入部位は、component II'では 73 位のロイシンの位置に対応する。したがって、I76G 変異型 HepPP 合成酵素では、73 位のロイシンがプレニル鎖延長を妨げていると予想される。I76G に加え 73 位も置換した変異型 HepPP 合成酵素は、 $C_{50}$  より長鎖の生成物を与えるかもしれない。

FPP をアリル性基質に用いたとき、I76G 変異型 HepPP 合成酵素は、野生型酵素に比べ生成物中の  $C_{20}$ - $C_{30}$  の割合が高くなった (図 6-3A、表 6-1)。同様のことが、I76G に対応する置換をもち野生型酵素よりも長鎖の生成物を与える変異型 *B. stearrowthermophilus* FPP 合成酵素と変異型 *S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素で観察された (16-18, 20)。いくつかの野生型 E 型長鎖プレニルニリン酸合成酵素では、IPP や  $Mg^{2+}$  濃度が低いときに短鎖中間体が生成することが報告されている (26, 27)。これらの報告は、基質と酵素との親和性が低下すると中間体の生成比率が増加する傾向があることを示唆した。component II'の 76 位のイソロイシンは、 $C_{35}$  の生成物と疎水的に相互作用し、それによって酵素が最終生成物と結合している状態を、鎖延長反応が進行中の状態よりも安定にするのかもしれない。その結果、76 位のイソロイシンは短鎖中間体の生成を抑制するのであろう。I76G の置換は、障害物を除き生成物鎖長を伸ばす一方で、この安定化の効果も排除してしまうと推測される。

FPP をアリル性基質に用いたとき、野生型 HepPP 合成酵素は HepPP をほぼ唯一の生成物として与えた。しかし、GGPP をアリル性基質に用いた場合には、野生型酵素は GGPP に IPP を 1 分子縮合させた段階で生じた GFPP を解離させ、生成物中の GFPP の割合が FPP を用いた場合に比べて増加した (図 6-3、表 6-1)。この結果は、野生型酵素が GGPP よりも FPP の方を優先的にアリル性基質として受け入れる傾向があることを示しており、*in vivo* では FPP が本来のアリル性基質であることを示唆している。



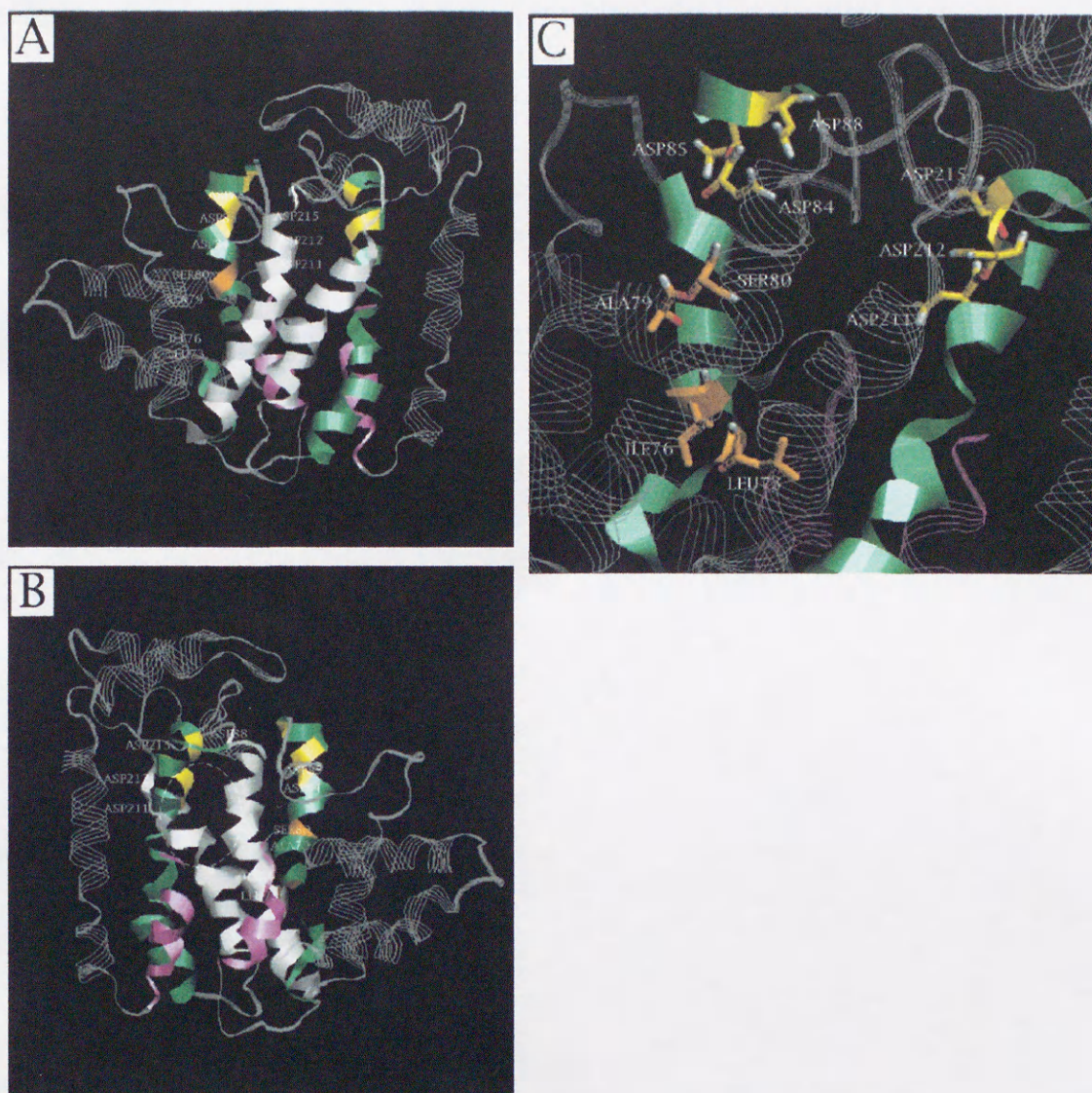


図 6-5 *B. stearothermophilus* HepPP 合成酵素の三次元構造モデル  
 (A、B) 全体の立体構造 (B) FARM 周辺領域の立体構造



A79Y または S80F の置換をもつ変異型 HepPP 合成酵素は、変異によって縮合反応の活性を減少させることなく GGPP を主生成物として与え、少量の GFPP を生成した (図 6-3B、表 6-1)。これらの結果は、導入された嵩高い残基は、基本的な触媒能の減少によってではなく、鎖延長を妨げることによって野生型酵素よりも短い鎖長の生成物を与えることを示している。しかし、これらの嵩高い残基はプレニル鎖を完全にブロックすることはできず、生成物の一部はこれらの残基によって新たに形成されたポケットの底から漏れ出すと考えられる (図 6-6C、D)。A79Y と S80F の 2 つの置換をもつ変異型酵素は、基本的な触媒能を減少させずにプレニル鎖延長を完全にブロックできるのかもしれない。

これらの結果はすべて、野生型 HepPP 合成酵素が、76 位に嵩高い残基を、79 位と 80 位に小さな残基を設置することによって生成物特異性を獲得したことを強く示唆した。

1998 年に Zhang らは、*Bacillus subtilis* HepPP 合成酵素に関して *B. stearothermophilus* HepPP 合成酵素の component I' に対応するサブユニットが、アリル性基質認識に関わることを報告している (28)。さらに、小池らによって行われたサブユニット交換実験から、component II' と component I' に対応する *B. subtilis* HepPP 合成酵素のサブユニットの組み合わせで HepPP 合成活性が生じることがわかった (21)。したがって、component I' は、これに対応する *B. subtilis* の酵素のサブユニットと同じ機能をもつと考えられる。しかし、生成物鎖長制御に関する component I' の機能は不明のままである。component II' の構造モデルでは 6 個の  $\alpha$ -ヘリックスが生成物の炭化水素鎖を収容するための疎水性キャビティを形成するが、このキャビティの壁の一端が欠けているように見える (図 6-5B)。キャビティの欠けた壁を構成する部分が component I' 内にあるのかもしれない。

*B. stearothermophilus* HepPP 合成酵素の生成物鎖長制御機構を部位特異的変異導入を利用してある程度解明することができた。1998 年に岡田らは、*E* 型長鎖プレニルニリン酸合成酵素に分類される *Gluconobacter suboxydans* 由来デカプレニルニリン酸合成酵素に関して我々と同様の手法で解析を行った (29)。ここで示した結果は、彼らの結果と合わせて、すべての *E* 型プレニルニリン酸合成酵素が共通の機構で生成物鎖長を制御することを示す有力な証拠となった。



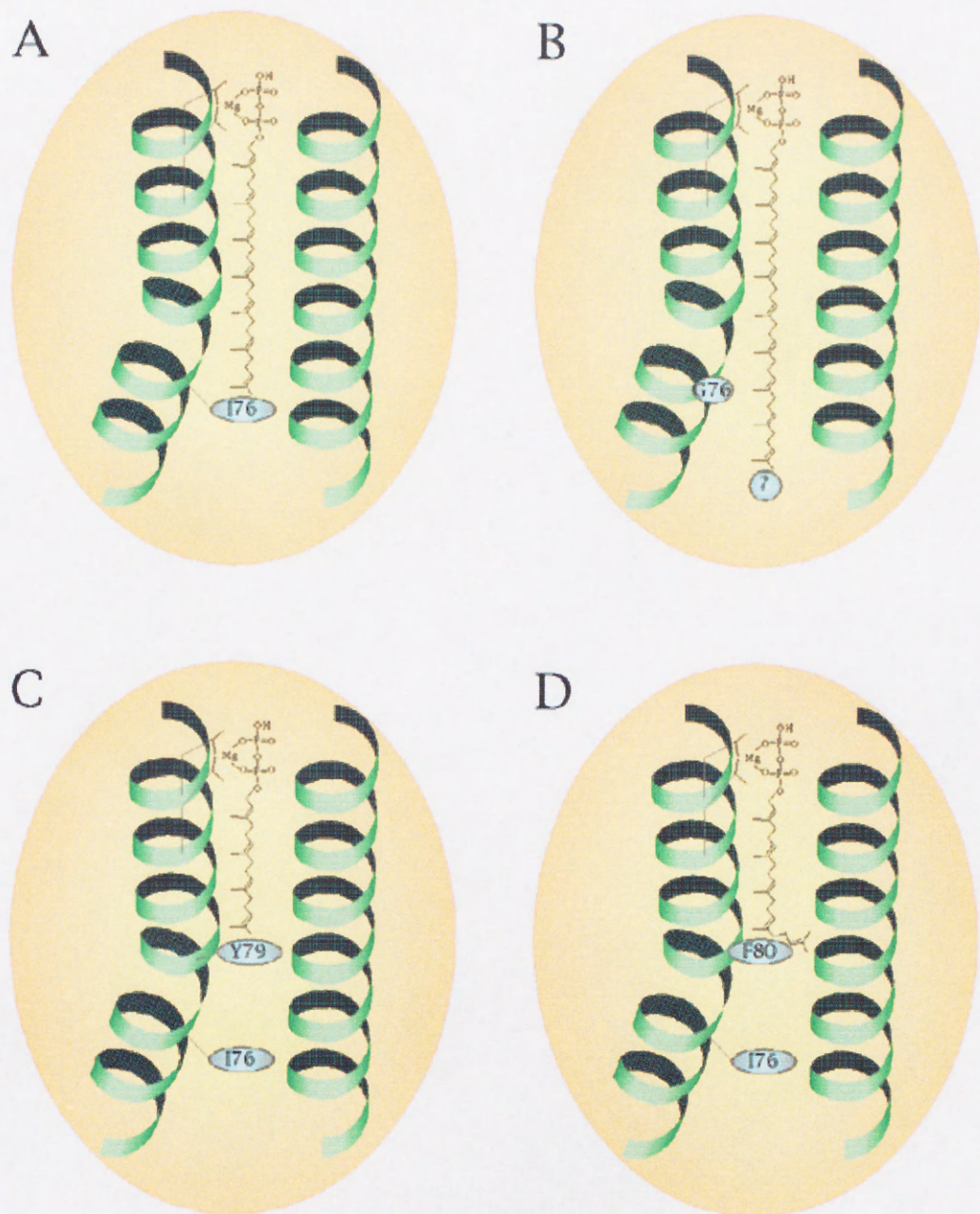


図 6-6 野生型および変異型 HepPP 合成酵素の鎖延長機構モデル

A: 野生型 HepPP 合成酵素

B: I76G 変異型 GGPP 合成酵素

C: A79Y 変異型 GGPP 合成酵素

D: S80F 変異型 GGPP 合成酵素



## 参考文献

1. Ogura, K. and Koyama, T. (1997) in *Dynamic Aspects of Natural Products Chemistry* (Ogura, K. and Sankawa, U., eds) pp. 1-23. Kodansha Press, Tokyo.
2. Ogura, K. and Koyama, T. (1998) *Chem. Rev.* **98**, 1263-1276.
3. Ding, V. D., Sheares, B. T., Bergstrom, J. D., Ponpipom, M. M., Perez, L. B., and Poulter, C. D. (1991) *Biochem. J.* **275**, 61-65.
4. Koyama, T., Obata, S., Osabe, M., Takeshita, A., Yokoyama, K., Uchida, M., Nishino, T., and Ogura, K. (1993) *J. Biochem. (Tokyo)* **113**, 355-363.
5. Ohnuma, S., Suzuki, M., and Nishino, T. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 14792-14797.
6. Ohto, C., Nakane, H., Hemmi, H., Ohnuma, S., Obata, S., and Nishino, T. (1998) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 1243-1246.
7. Asai, K., Fujisaki, S., Nishimura, Y., Nishino, T., Okada, K., Nakagawa, T., Kawamukai, M., and Matsuda, H. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, 340-345.
8. Ohnuma, S., Koyama, T., and Ogura, K. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 23706-23713.
9. Okada, K., Kamiya, Y., Zhu, X., Suzuki, K., Tanaka, K., Nakagawa, T., Matsuda, H., and Kawamukai, M. (1997) *J. Bacteriol.* **179**, 5992-5998.
10. Suzuki, K., Okada, K., Kamiya, Y., Zhu, X. F., Nakagawa, T., Kawamukai, M., and Matsuda, H. (1997) *J. Biochem. (Tokyo)* **121**, 496-505.
11. Shimizu, N., Koyama, T., and Ogura, K. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 1578-1581.
12. Koike-Takeshita, A., Koyama, T., Obata, S., and Ogura, K. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 18396-18400.
13. Zhang, Y. W., Koyama, T., and Ogura, K. (1997) *J. Bacteriol.* **179**, 1417-1419.
14. Tarshis, L. C., Yan, M., Poulter, C. D., and Sacchettini, J. C. (1994) *Biochemistry* **33**, 10871-10877.
15. Tarshis, L. C., Proteau, P. J., Kellogg, B. A., Sacchettini, J. C., and Poulter, C. D. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 15018-15023.
16. Ohnuma, S., Nakazawa, T., Hemmi, H., Hallberg, A. M., Koyama, T., Ogura, K., and Nishino, T. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 10087-10095.



17. Ohnuma, S., Narita, K., Nakazawa, T., Ishida, C., Takeuchi, Y., Ohto, C., and Nishino, T. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 30748-30754.
18. Ohnuma, S., Hirooka, K., Hemmi, H., Ishida, C., Ohto, C., and Nishino, T. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 18831-18837.
19. Ohnuma, S., Hirooka, K., Ohto, C., and Nishino, T. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 5192-5198.
20. Ohnuma, S., Hirooka, K., Tsuruoka, N., Yano, M., Ohto, C., Nakane, H., and Nishino, T. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 26705-26713.
21. Koike-Takeshita, A., Koyama, T., and Ogura, K. (1998) *J. Biochem. (Tokyo)* **124**, 790-797.
22. Koike-Takeshita, A., Koyama, T., and Ogura, K. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 12380-12383.
23. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
24. Fujii, H., Koyama, T., and Ogura, K. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **712**, 716-718.
25. Dayringer, H. E., Tramontano, A., Sprang, S. R., and Fletterick, R. J. (1986) *J. Mol. Graphics* **4**, 82-87.
26. Ohnuma, S., Koyama, T., and Ogura, K. (1992) *J. Biochem. (Tokyo)* **112**, 743-749.
27. Fujii, H., Sagami, H., Koyama, T., Ogura, K., and Seto, S. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **96**, 1648-1653.
28. Zhang, Y. W., Koyama, T., Marecak, D. M., Prestwich, G. D., Maki, Y., and Ogura, K. (1998) *Biochemistry* **37**, 13411-13420.
29. Okada, K., Kainou, T., Tanaka, K., Nakagawa, T., Matsuda, H., and Kawamukai, M. (1998) *Eur. J. Biochem.* **255**, 52-59.



## 第 7 章 結論

イソプレレン単位 ( $C_5$ ) が連なったプレニルニリン酸は、プレニルニリン酸合成酵素と総称される酵素群が触媒するアリル性基質へのイソペンテニルニリン酸 (IPP、 $C_5$ ) の縮合反応によって生合成される。プレニルニリン酸合成酵素は、生成物の構造によって、*E* 型短鎖、*E* 型中鎖、*E* 型長鎖、*Z* 型長鎖プレニルニリン酸合成酵素の 4 種類に分類されるが、生成物鎖長が厳密に規定されるという共通の性質をもつ。その生成物鎖長制御機構は 4 種類の酵素のいずれについても未解明であった。本研究では、変異型酵素を作製してその生成物鎖長を調べるという手法により、短鎖および中鎖プレニルニリン酸合成酵素の生成物鎖長制御機構の解明を試みた。以下に結果を章ごとにまとめて示す。

### 第 2 章 (1)

- 好熱性古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius* 由来ゲラニルゲラニルニリン酸 (GGPP、 $C_{20}$ ) 合成酵素のランダム変異ライブラリーから、 $C_{20}$  よりも長鎖の生成物を合成する変異型酵素を 5 種類単離した。
- 変異型酵素の解析の結果、アリル性基質結合部位であるアスパラギン酸に富む最初のモチーフ (First Aspartate-Rich Motif, FARM) から 5 残基上流にある 77 位のフェニルアラニンが生成物鎖長決定に重要であり、この位置をセリンに置換した変異型酵素からは  $C_{25}$  のプレニルニリン酸が主生成物として得られることがわかった。

### 第 3 章 (2)

- *S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素の FARM 周辺領域をファルネシルニリン酸 (FPP、 $C_{15}$ ) の対応する領域に置換することにより、GGPP 合成酵素から FPP 合成酵素に変換することができた。
- 変異型酵素の解析の結果、FARM 上流 4 番目と 5 番目がともに芳香族アミノ酸であること、あるいは FARM 上流 5 番目がチロシンで且つ FARM 内に挿入配列があることが FPP 生成に必須であることがわかった。

### 第 4 章 (3)

- *S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素の FARM 上流 5 番目、8 番目、11 番目を小さな残基のアミノ酸に置換することにより、 $C_{30}$ - $C_{40}$  が長鎖主生成物として得られ、 $C_{100}$  近くの鎖長の生成物もわずかに検出された。
- 中等度好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* 由来 FPP 合成酵素においても対応する位置を小さな残基に置換することにより、 $C_{30}$  以上の長鎖生成物が得られることがわかった。
- 変異型酵素の解析とヒナドリ由来 FPP 合成酵素の立体構造から、GGPP 合成酵素あるいは FPP 合成酵素といった短鎖プレニルニリン酸合成酵素は共通の機構で生成物鎖長を決定することが示された。つまり、IPP の縮合反応に伴い、FARM 周辺領域が形成する  $\alpha$ -ヘリックスに沿ってプレニル鎖が伸長し、それを FARM 上流 5 番目あるいは 4 番目にある嵩高い残基がブロックして正確に伸長反応を停止させるというものである。



## 第5章 (4)

- ヒナドリ由来 FPP 合成酵素の立体構造を鋳型に構築した *S. acidocaldarius* GGPP 合成酵素の立体構造モデルから、第4章で作製した FARM 上流に小さな残基を導入した変異型酵素では、酵素内部の折れ曲がった通路をプレニル鎖が通過することが示唆された。
- 構造モデルから、77 位のフェニルアラニンと 114 位のヒスチジンを小さな残基に置換すれば直線上の通路が形成され、効率的に長鎖生成物が得られると予想した。実際に変異型酵素を作製して解析した結果、それぞれ  $C_{30}$ - $C_{50}$  を長鎖主生成物として与え、 $C_{100}$  近くの鎖長の生成物もわずかにみられた。
- 変異型酵素の解析から、114 位のヒスチジンがプレニル鎖が収容されるキャビティの形成に重要であることが示された。

## 第6章 (5)

- 第2章-第4章で得られた短鎖プレニルニリン酸合成酵素の生成物鎖長制御機構に関する情報をもとに、中鎖プレニルニリン酸合成酵素に分類される *B. stearothermophilus* ヘプタプレニルニリン酸 (HepPP、 $C_{35}$ ) 合成酵素における生成物鎖長決定に重要な残基は、サブユニットの1つである component II' 内にある FARM 上流4番目、5番目、8番目の残基であると予想した。これらの位置に置換をもつ変異型酵素を作製して解析した結果、FARM 上流8番目を小さな残基に置換した変異型酵素は  $C_{35}$  よりも長鎖の生成物を与え、FARM 上流4番目または5番目に芳香族アミノ酸を導入した変異型酵素では  $C_{20}$  が主生成物となることがわかった。
- 変異型酵素の解析から、野生型 HepPP 合成酵素では component II' の FARM 周辺領域が形成する  $\alpha$ -ヘリックスに沿ってプレニル鎖が伸び、FARM 上流4番目と5番目の小さな残基はプレニル鎖を通過させ、鎖長が  $C_{35}$  になったところで FARM 上流8番目の嵩高い残基がブロックして伸長を停止させることがわかった。

本研究で述べたいずれの結果も、短鎖および中鎖プレニルニリン酸合成酵素において FARM 上流への変異が生成物鎖長の変化を引き起こすことを明確に示しており、短鎖および中鎖プレニルニリン酸合成酵素の多くが、プレニル鎖の伸長を嵩高いアミノ酸でブロックするという共通の機構で生成物鎖長を制御することを強く示唆するものである。

本研究を含む我々のグループによる生成物鎖長制御機構に関する研究において得られた E 型プレニルニリン酸合成酵素の生成物特異性の変換の結果を図 7-1 に模式的にまとめた (6)。鎖長決定 (Chain Length Determination, CLD) 領域において、FARM 上流の芳香族アミノ酸と FARM 内への挿入配列は、生成物鎖長が短くなるように作用する。例えば、FARM 上流5番目に芳香族アミノ酸が存在して挿入配列がなければ古細菌の GGPP 合成酵素となり、 $C_{20}$  の生成物を与える。FARM 上流4番目と5番目に芳香族アミノ酸が存在して挿入配列がなければ真核生物の FPP 合成酵素となり、生成物鎖長は  $C_{15}$  である。FARM 上流5番目に芳香族アミノ酸 (特にチロシン) が存在して挿入配列も存在すれば原核生物の FPP 合成酵素となり、この場合も生成物鎖長は  $C_{15}$  である。FARM 上流の芳香族アミノ酸も挿入配列もなければ中鎖および長鎖プレニル



ニリン酸合成酵素となる。この法則は多くの *E* 型プレニルニリン酸合成酵素において適用されるが例外も存在し、酵母やほ乳類の GGPP 合成酵素では FARM 上流 5 番目に芳香族アミノ酸がなく、挿入配列もないにも関わらず、生成物鎖長は  $C_{20}$  である (7, 8)。また、植物のゲラニルニリン酸 ( $C_{10}$ ) 合成酵素は挿入配列をもつが、FARM 上流に芳香族アミノ酸は存在せず、しかも他の短鎖プレニルニリン酸合成酵素とは違ってヘテロダイマーを形成する (9)。これらの例外的な酵素においては、本研究で述べたのとは別のアミノ酸が関与する別の生成物鎖長制御機構が作用する可能性があるか、またはここで述べた法則も包括する普遍的な鎖長制御の法則が存在するのかもしいない。いずれにせよ、今後ここで示した法則があてはまらない *E* 型プレニルニリン酸合成酵素の生成物鎖長制御に関する解析を行う必要があると思われる。

古山らのグループによって、1998 年に *Z* 型長鎖プレニルニリン酸合成酵素として初めて *Micrococcus luteus* ウンデカプレニルニリン酸 ( $C_{55}$ ) 合成酵素の遺伝子が単離され (10)、1999 年には酵素の結晶化に成功して X 線構造解析の予備的データが得られ (11)、立体構造が明らかとなりつつある。*Z* 型長鎖プレニルニリン酸合成酵素は、*E* 型プレニルニリン酸合成酵素とは全く異なる配列と立体構造をもつが、どのようにして生成物鎖長を制御するのであろうか。今後、立体構造をもとに *Z* 型酵素の生成物鎖長制御機構の解明が進むと予想されるが、この酵素においても *E* 型酵素と同様の鎖長制御機構が働いており、プレニル鎖を疎水性キャビティの中に収容して鎖延長を嵩高いアミノ酸が妨げることで生成物鎖長が決定されるのではないかと考えられ、今後の研究が待たれる。

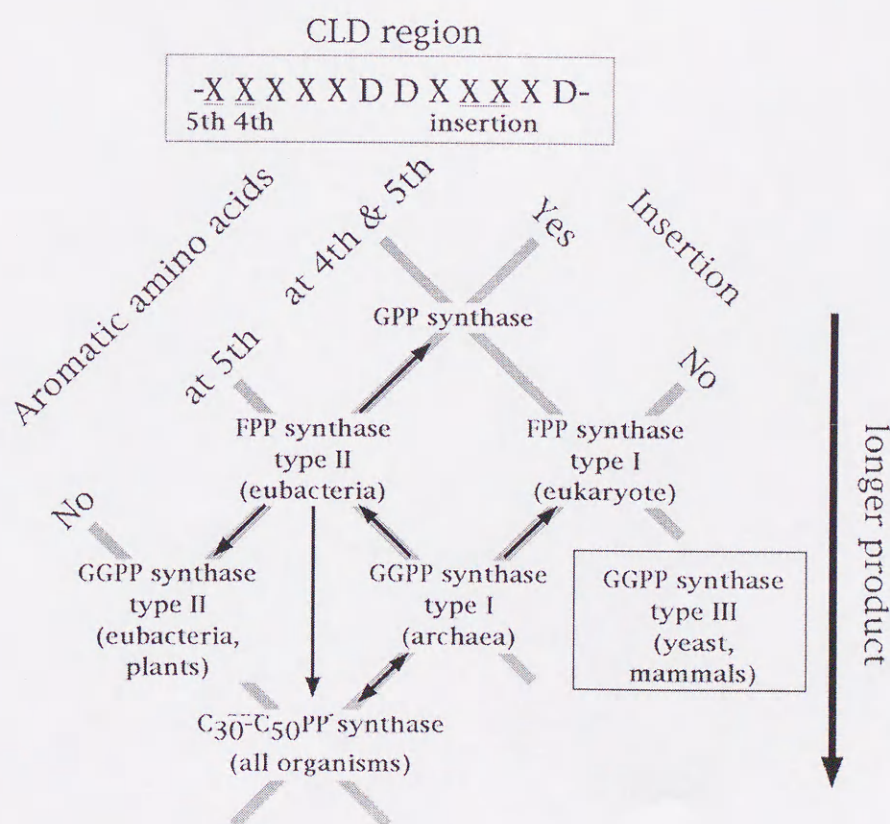


図 7-1 生成物鎖長決定領域



## 参考文献

1. Ohnuma, S., Hirooka, K., Hemmi, H., Ishida, C., Ohto, C., and Nishino, T. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 18831-18837.
2. Ohnuma, S., Hirooka, K., Ohto, C., and Nishino, T. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 5192-5198.
3. Ohnuma, S., Hirooka, K., Tsuruoka, N., Yano, M., Ohto, C., Nakane, H., and Nishino, T. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 26705-26713.
4. Hirooka, K., Kato, T., Matsu-ura, J., Hemmi, H., and Nishino, T. (2000) *FEBS Lett. in press*.
5. Hirooka, K., Ohnuma, S., Koike-Takeshita, A., Koyama, T., and Nishino, T. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 4520-4528.
6. Ohnuma, S. and Wang, K. (1999) *Trends Biochem. Sci.* **24**, 445-451.
7. Jiang, Y., Proteau, P., Poulter, D., and Ferro-Novick, S. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 21793-21799.
8. Kuzuguchi, T., Morita, Y., Sagami, I., Sagami, H., and Ogura, K. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 5888-5894.
9. Burke, C. C., Wildung, M. R., and Croteau, R. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 13062-13067.
10. Shimizu, N., Koyama, T., and Ogura, K. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 19476-19481.
11. Fujihashi, M., Shimizu, N., Zhang, Y. W., Koyama, T., and Miki, K. (1999) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **55**, 1606-1607.



## 謝辞

本研究を行うにあたり、熱心なご指導を賜りました西野徳三教授に深く感謝します。また、本論文の審査をして下さり、ご助言を頂いた野澤庸則教授、熊谷泉教授に深く感謝します。

大沼信一博士には、私が学部4年生で研究室に配属されてから修士課程を終えるまで直接に研究の指導をして頂きました。また、大沼博士が海外に移ってからも研究の助言や投稿論文の校正をして頂きました。本当にありがとうございました。

研究を行う上で、試料提供など多くのご援助を賜りました東北大学反応化学研究所の小倉協三名誉教授、古山種俊教授に深く感謝します。古山教授には研究の助言や投稿論文の校正もして頂きました。改めて御礼申し上げます。

中山亨助教授にはお忙しいにも関わらず、研究の進め方や投稿論文の書き方などを親切に教えて頂きました。辺見久助手には実験の際に技術的なことをいろいろ親切に教えて頂きました。心から感謝します。RI 実験を効率的に行うことができたのは、施設の管理をして下さった赤井稔技官のおかげです。ありがとうございました。

本論文第2章から第4章までの共同研究者であるトヨタ自動車株式会社バイオラボの大音徳博士とバイオラボの方々、第4章での共同研究者である鶴岡直樹君と矢野誠恭君、第5章での共同研究者である加藤竜也君と松浦淳一郎君、第6章での共同研究者である小池あゆみ博士に深く感謝します。

最後に、私が充実した研究生活を送ることができたのは、経済的に支えてくれた両親と、内気な中にアクティブな魂を秘めた西野研究室の皆さんのおかげです。心から感謝します。本当にありがとうございました。

2000年8月

広岡 和丈







